

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 12 月 24 日 (24.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/106682 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/12, 1/19, 1/21,  
5/10, C07K 7/06, 14/82, C12P 21/02, C07K 16/32, A61K  
38/17, 39/00, 39/395, 31/7088, A61P 35/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/07463

(22) 国際出願日: 2003 年 6 月 12 日 (12.06.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-171518 2002 年 6 月 12 日 (12.06.2002) JP  
特願2002-275572 2002 年 9 月 20 日 (20.09.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中  
外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI  
KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間 5 丁  
目 5 番 1 号 Tokyo (JP). 住友製薬株式会社 (SUMIT-  
OMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED)  
[JP/JP]; 〒541-8510 大阪府大阪市中央区道修町 2 丁  
目 2 番 8 号 Osaka (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 杉山 治夫 (SUGIYAMA, Haruo) [JP/JP]; 〒  
562-0036 大阪府箕面市船場西 2-19-30 Osaka  
(JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 後藤 正志

(GOTOH, Masashi) [JP/JP]; 〒569-0081 大阪府高  
槻市宮野町 9-12-505 Osaka (JP). 高須 秀夫  
(TAKASU, Hideo) [JP/JP]; 〒662-0084 兵庫県西宮市  
榎之池町 15-17-502 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 河宮 治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒  
540-0001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号  
IMPビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,  
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI,  
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,  
ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HLA-A24-RESTRICTED CANCER ANTIGEN PEPTIDE

(54) 発明の名称: HLA-A24 拘束性癌抗原ペプチド

(57) Abstract: It is intended to provide an HLA-A24-restricted peptide originating in Wt1 which has an activity of inducing CTL *in vivo*; a polynucleotide encoding this peptide; a cancer vaccine using the above peptide or polypeptide *in vivo* or *in vitro*; etc. The above cancer vaccine is usable in treating a large number of patients suffering from cancer.

(57) 要約: イン・ビボでCTL誘導活性を有するWT1由来のHLA-A24拘束性ペプチド、当該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはこれらペプチドやポリヌクレオチドをin vivoまたはin vitroで利用した癌ワクチンなどを提供する。本発明の癌ワクチンは多くの癌患者を処置することができる。

## 明 細 書

## H L A - A 2 4 拘束性癌抗原ペプチド

## 5 技術分野

本発明は癌ワクチン療法の分野に属し、H L A - A 2 4 拘束性癌抗原ペプチドに関する。詳細には、本発明は、イン・ビボでC T L誘導活性を有するW T 1由来のH L A - A 2 4 拘束性癌抗原ペプチドおよびそれをコードするポリヌクレオチド、ならびにそれを含有する癌ワクチン、癌ワクチンとしての使用およびそれ

10 利用する癌の治療・予防方法に関する。

## 背景技術

生体による癌細胞やウイルス感染細胞等の排除には細胞性免疫、とりわけ細胞傷害性T細胞（以下、C T Lと称する）が重要な働きをしている。C T Lは、癌細胞上の癌抗原タンパク質由来の抗原ペプチド（癌抗原ペプチド）とM H C

15 (Major Histocompatibility Complex) クラス I 抗原（ヒトの場合はH L A 抗原と称する）により形成される複合体を認識し、癌細胞を攻撃・破壊する。

癌抗原タンパク質は、Immunity, vol.10: 281, 1999のtable1に記載のものが代表例として挙げられる。具体的にはメラノサイト組織特異的タンパク質である

20 g p 1 0 0 (J. Exp. Med., 179: 1005, 1994)、M A R T - 1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 3515, 1994)、およびチロシナーゼ (J. Exp. Med., 178: 489, 1993) などのメラノソーム抗原、メラノーマ以外の癌抗原タンパク質としてはH E R 2 / n e u (J. Exp. Med., 181: 2109, 1995)、C E A (J. Natl. Cancer. Inst., 87: 982, 1995)、およびP S A (J. Natl. Cancer. Inst.,

25 89: 293, 1997) などの癌マーカーが挙げられる。癌抗原ペプチドは、癌抗原タンパク質が細胞内プロテアーゼによりプロセシングされて生成される約8から11個のアミノ酸から成るペプチドであり (Cur. Opin, Immunol., 5:709, 1993; Cur. Opin, Immunol., 5: 719, 1993; Cell, 82: 13, 1995; Immunol. Rev., 146: 167, 1995)、前記のように、この生成された癌抗原ペプチドとM H C クラ

ス I 抗原 (HLA 抗原) との複合体が細胞表面に提示され、CTL により認識される。従って、CTL による癌細胞破壊を利用する癌免疫療法剤 (癌ワクチン) を開発する場合、CTL を効率良く誘導できる癌抗原ペプチドを癌抗原タンパク質より同定することが、非常に重要となる。

5 MHC クラス I 分子は、多くのサブタイプが存在し、結合できる抗原ペプチドのアミノ酸配列にはそれぞれのタイプについて規則性 (結合モチーフ) が存在する。例えば、HLA-A 2 の結合モチーフは、2 番目のアミノ酸がロイシン、メチオニンまたはイソロイシン、9 番目のアミノ酸がバリン、ロイシンまたはイソロイシンである。また HLA-A 24 の結合モチーフは、2 番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファン、9 番目のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。また最近では、前記モチーフを含む HLA 抗原への推定結合配列をデータベース上で検索することも可能である (例えば BIMAS ソフト ([http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/)))。従って、CTL を誘導できる癌抗原ペプチドを癌抗原タンパク質より同定するには、第一に、癌抗原タンパク質の  
10 アミノ酸配列より目的の HLA タイプの結合モチーフまたは推定結合配列に一致する約 8 から 11 個のアミノ酸より構成されるペプチド領域を同定する。

しかしながら、結合モチーフや推定結合配列より同定されたペプチドが必ず免疫原性を有するとは限らない。癌抗原ペプチドは癌抗原タンパク質が細胞内でプロセッシングされることにより生成されるため、プロセッシングにより生成されないペプチドは抗原ペプチドとはなり得ない。さらに、結合モチーフや推定結合配列を有するペプチドが実際に癌抗原ペプチドとして細胞内で生成されても、多くの癌抗原タンパク質は本来生体に存在する正常な物質であるため、CTL はこれら癌抗原に対してトレランスとなっている場合がある。以上のことから、CTL 誘導活性を有する癌抗原ペプチドを同定するためには、目的の HLA タイプの結合  
20 モチーフ・推定結合配列による予測のみでは不十分であり、イン・ビボでの免疫原性 (CTL 誘導活性) の評価が重要となる。

25 W i l m s 癌の癌抑制遺伝子 WT 1 (WT 1 遺伝子) は、W i l m s 癌、無紅彩、泌尿生殖異常、精神発達遅延などを合併する W A G R 症候群の解析から W i

1 m s 癌の原因遺伝子の 1 つとして染色体 1 1 p 1 3 から単離され (Nature, 343: 774, 1990)、そのゲノム DNA は約 5 0 kb で 1 0 のエクソンから成り、その c DNA は約 3 k b である。c DNA から推定されるアミノ酸配列は、配列番号: 1 に示す通りである (Cell., 60:509, 1990)。WT 1 遺伝子はヒト白血病  
5 で高発現しており、白血病細胞を WT 1 アンチセンスオリゴマーで処理するとその細胞増殖が抑制される (特開平 9-1 0 4 6 2 7 号公報) ことなどから、WT 1 遺伝子は白血病細胞の増殖に促進的に働いていることが示唆されている。さらに、WT 1 遺伝子は、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌においても高発現しており (特  
10 開平 9-104627 号公報、特開平 11-35484 号公報)、白血病および固形癌における新しい癌抗原タンパク質であることが判明した (J. Immunol., 164: 1873-80, 2000、J. Clin. Immunol., 20, 195-202, 2000)。癌免疫療法剤 (癌ワクチン) は多くの癌患者に対して適用可能であることが好ましいことから、多くの癌種で高発現している WT 1 における癌抗原ペプチドの同定、および当該癌抗原ペプチ  
15 ドを利用した癌ワクチンの開発は重要である。これに関して W000/06602 号公報および W000/18795 号公報には、WT 1 タンパクの部分から成る幾つかの天然型の癌抗原ペプチドが記載されている。

前記癌ワクチンの開発においてイン・ビボにおける有用性を評価するには、実験動物として一般に使用されている純系マウスは使用できず、HLA を発現する  
20 ヒトモデル動物を用いる必要がある。すなわち、癌ワクチンとして用いられるヒト抗原ペプチドは、HLA に提示されることにより特異的免疫応答を誘導することが可能となるものであるが、当該 HLA はヒトに特異的な MHC クラス I 分子であるため、HLA を有さない非ヒト動物をヒト治療用癌ワクチンのイン・ビボ評価に使用することは出来ない。従って、前記のように癌ワクチンの有用性の評価に  
25 は、HLA を発現するヒトモデル動物が必要である。

#### 発明の開示

本発明の目的は、イン・ビボにおいて免疫原性 (CTL 誘導活性) を有する WT 1 由来の癌抗原ペプチド、およびそれを含有する癌ワクチン、その癌ワクチン

としての使用およびそれを利用する癌の治療・予防方法を提供することにある。

最近、HLA-A 24 抗原を発現しイン・ビボでの評価に使用できるヒトモデル動物が作製され、特許出願されている（WO 02/47474、国際公開日：2002年6月20日、出願人：住友製薬株式会社）。

- 5       これにより、HLA-A 24 拘束性癌抗原タンパク、癌抗原ペプチドおよびこれらの遺伝子をイン・ビボで評価することができるようになった。

本発明者らは、前記ヒトモデルマウスを用いて、WT 1 に由来するHLA-A 24 拘束性の天然型ペプチドおよび改変型ペプチドの評価を行った。すなわち、BIMASソフト（[http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/)）により推定した  
10       WT 1 中のHLA-A 24 抗原への推定結合配列（結合モチーフ）を有するペプチドについて評価した結果、以下の天然型ペプチド：

ペプチドA：Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu（配列番号：8）

ペプチドB：Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu（配列番号：7）

ペプチドC：Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe（配列番号：9）

15       ペプチドD：Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe（配列番号：10）

ペプチドE：Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe（配列番号：11）

において、唯一ペプチドB（配列番号：7）のみが、イン・ビボにて免疫原性（CTL誘導活性）を有することを見出した。

さらに前記ペプチドA～Cの第2位のアミノ酸をチロシン（Tyr）に改変した以下の改変型ペプチド：  
20       

ペプチドF：Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu（配列番号：2）

ペプチドG：Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu（配列番号：3）

ペプチドH：Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe（配列番号：4）

を作製し同様の評価を行った。その結果、改変型ペプチドGは、もとの天然型ペプチドBよりも、より高い免疫原性を有することを見出した。また、天然型ペプチドAおよびCが免疫原性を有していなかったにもかかわらず、その改変型ペプチドFおよびHは、高い免疫原性（CTL誘導活性）を有することを見出した。  
25       

さらに、前記と同様、BIMASソフトにより検索されたWT 1 中のHLA-A 24 抗原への推定結合配列を有するヒトWT 1 由来の以下の天然型ペプチド（ペプ

チドK、L)、およびその第2位のアミノ酸をチロシンに改変した以下の改変型ペプチド(ペプチドI、J) :

ペプチドK : Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号 : 5 1)

ペプチドL : Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号 : 5 2)

5 ペプチドI : Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号 : 5)

ペプチドJ : Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号 : 6)

についても同様の評価を行った。その結果、天然型ペプチドKおよびLは免疫原性(C T L誘導活性)を有していなかったにもかかわらず、その改変型ペプチドIおよびJはイン・ビボで高い免疫原性(C T L誘導活性)を有することを見出し

10 た。

これらの知見から、本発明者らは、前記配列番号 : 2 ~ 6 で示された改変型ペプチド、および配列番号 : 7 で示された天然型ペプチドは、癌ワクチンとして種々の形態で利用可能であるとの確信を得た。本発明はかかる知見に基づいて完成されたものである。

15 すなわち、本発明は :

(I) 以下のアミノ酸配列 :

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号 : 2) 、

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号 : 3) 、

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号 : 4) 、

20 Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号 : 5) 、および

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号 : 6) 、

のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド ; または配列番号 : 2、3、4、5 および 6 のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチド ; あるいは

25 配列番号 : 2、3、4、5 および 6 のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み、かつ H L A - A 2 4 拘束性の C T L 誘導活性を有するペプチド (ただし、配列番号 7 のアミノ酸配列を有するペプチドは除く) 、好ましくは配列番号 : 2、3、5 および 6 のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列の第 9 位のロイシンをフェニルアラニン、

トリプトファン、イソロイシンまたはメチオニンに置換した改変アミノ酸配列を含む、本発明のペプチド；配列番号：4のアミノ酸配列の第9位のフェニルアラニンをトリプトファン、ロイシン、イソロイシンまたはメチオニンに置換した改変アミノ酸配列を含む、本発明のペプチド； または配列番号：4のアミノ酸配列の第5位のシステインをアラニン、セリンまたは $\alpha$ -アミノ酪酸に置換した改変アミノ酸配列（配列番号：66、67または68）を含む、本発明のペプチド；または配列番号：2、3、4、5および6のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列からなる、本発明のペプチド；

(I I) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド、好ましくは配列番号：2～6および66～68のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列をコードする、本発明のポリヌクレオチド；あるいは、本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター；あるいは、本発明の発現ベクターを含有する形質転換細胞；あるいは、本発明の細胞を、ペプチドの発現可能な条件下で培養することを特徴とする、本発明のペプチドの製造方法；

(I I I) 本発明のペプチドに特異的に結合する抗体；

(I V) 本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞、好ましくは配列番号：2～6および66～68のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体が提示されている、本発明の抗原提示細胞；

(V) 本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を認識するCTL、好ましくは配列番号：2～6および66～68のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を認識する、本発明のCTL；および

(V I) 本発明のペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明の発現ベクター、本発明の形質転換細胞、本発明の抗原提示細胞、あるいは本発明のCTLと、薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物、具体的には癌ワクチン、ならびに本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクター、形質転換細胞、抗原提示細胞あるいはCTLにおける癌ワクチンを製造するための使用、およびそれら

発明の治療または予防に有効な量をそれを必要としている癌患者に投与する癌を治療または予防するための方法に関する。

さらに、本発明は、

(V I I) 以下の a) ~ f)

- 5 a) Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：7) を含むペプチド、  
b) 上記 a) のペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
c) 上記 b) のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、  
d) 上記 c) の発現ベクターを含有する細胞、  
e) 上記 a) のペプチド由来の癌抗原ペプチドと H L A - A 2 4 抗原との複合体  
10 が提示されている抗原提示細胞、および  
f) 上記 a) のペプチド由来の癌抗原ペプチドと H L A - A 2 4 抗原との複合体  
を認識する C T L、  
のなかから選ばれるいずれかと薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物、  
具体的には癌ワクチン、ならびに上記ペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクタ  
15 ー、形質転換細胞、抗原提示細胞あるいは C T L における癌ワクチンを製造する  
ための使用、およびそれら発明の治療または予防に有効な量をそれを必要として  
いる癌患者に投与する癌を治療または予防するための方法に関する。

#### 図面の簡単な説明

20 図 1 は、本発明のキメラ遺伝子 (H L A - A 2 4 0 2 / K<sup>b</sup> 遺伝子) の作製に用いた H - 2 K<sup>b</sup>  
ゲノム DNA の構築方法を示す模式図である。

図 2 は、本発明のキメラ遺伝子である H L A - A 2 4 0 2 / K<sup>b</sup> 遺伝子の構築方法を示す模  
式図である。

25 図 3 は、配列番号：33 に記載の H L A - A 2 4 0 2 / K<sup>b</sup> ゲノム配列の第 1 位 ~ 第 1300 位  
までと、配列番号：34 に記載の H L A - A 2 4 0 2 / K<sup>b</sup> cDNA 配列の第 1 位 ~ 第 407 位まで  
の位置関係を示したものである。

図 4 は、配列番号：33 に記載の H L A - A 2 4 0 2 / K<sup>b</sup> ゲノム配列の第 1301 位 ~ 第  
2600 位までと、配列番号：34 に記載の H L A - A 2 4 0 2 / K<sup>b</sup> cDNA 配列の第 408 位 ~ 第  
1015 位までの位置関係を示したものである。



図5は、配列番号：33に記載のHLA-A2402/K<sup>b</sup> ゲノム配列の第2601位～第3857位までと、配列番号：34に記載のHLA-A2402/K<sup>b</sup> cDNA配列の第1016位～第1119位までの位置関係を示したものである。

図6は、HER-2/neu由来抗原ペプチド (HER2/neu<sub>780-788</sub>) で本発明のHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸は細胞傷害性活性 (% Specific Lysis) を、また横軸は各トランスジェニックマウスの名称を示す。また図中、pep+はペプチドパルスした標的細胞を用いた結果を、pep-はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

図7は、MAGE-3由来抗原ペプチド (MAGE-3<sub>195-203</sub>) で本発明のHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図8は、CEA由来抗原ペプチド (CEA<sub>652-660</sub>) で本発明のHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図9は、CEA由来抗原ペプチド (CEA<sub>268-277</sub>) で本発明のHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図10は、ヒトWT1由来抗原ペプチドA (WT1<sub>126-134</sub>) でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されないことを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図11は、ヒトWT1由来抗原ペプチドB (WT1<sub>302-310</sub>) でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図12は、ヒトWT1由来抗原ペプチドC (WT1<sub>417-425</sub>) でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されないことを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図13は、ヒトWT1由来抗原ペプチドD (WT1<sub>285-294</sub>) でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されないことを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図14は、ヒトWT1由来抗原ペプチドE (WT1<sub>326-335</sub>) でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されないことを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図15は、ヒトWT1由来抗原ペプチドA (WT1<sub>126-134</sub>) の第2位をチロシンに改変した改変型ペプチド (ペプチドF) でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図16は、ヒトWT1由来抗原ペプチドB (WT1<sub>302-310</sub>) の第2位をチロシンに改変した改変型ペプチド (ペプチドG) でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図17は、ヒトWT1由来抗原ペプチドC (WT1<sub>417-425</sub>) の第2位をチロシンに改変した改変型ペプチド (ペプチドH) でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図18は、ヒトWT1由来抗原ペプチドK (WT1<sub>10-18</sub>) の第2位をチロシンに改変した改変型ペプチド (ペプチドI) でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図19は、ヒトWT1由来抗原ペプチドL (WT1<sub>239-247</sub>) の第2位をチロシンに改変した改変型ペプチド (ペプチドJ) でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図20は、改変型ペプチドHによって誘導されたエフェクター細胞の天然型ペプチドに対する交差反応性を試験した結果を示したグラフである。図中、縦軸はCTL誘導活性 (% Specific Lysis) を、また横軸は各トランスジェニックマウスの名称を示す。また図中、白棒は改変型ペプチド (ペプチドH) をパルスした標的細胞を用いた結果を、点線棒は天然型ペプチド (ペプチドC) をパルスした標的細胞を用いた結果を、また黒棒はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

図 2 1 は、ヒトWT1由来抗原ペプチドK (WT1<sub>10-18</sub>) でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されないことを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図 6 におけると同義である。

図 2 2 は、ヒトWT1由来抗原ペプチドL (WT1<sub>239-247</sub>) でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されないことを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図 6 におけると同義である。

図 2 3 は、ヒトWT1由来抗原ペプチドB (WT1<sub>302-310</sub>)、またはそのペプチドの第2位をチロシンに改変した改変型ペプチド (ペプチドG) でHLA-A2402陽性の健常人末梢血単核球を in vitroで刺激してCTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸は細胞傷害活性を、また横軸はエフェクター細胞 (E) とターゲット細胞 (T) の比率E/Tを示す。黒丸は多重改変ペプチド、黒三角は天然型ペプチドで刺激したエフェクター細胞による細胞傷害活性を示す。

図 2 4 は、ヒトWT1由来抗原ペプチドB (WT1<sub>302-310</sub>)、またはそのペプチドの第2位をチロシンに改変した改変型ペプチド (ペプチドG) でHLA-A2402陽性の健常人末梢血単核球を in vitroで刺激してCTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸は細胞傷害活性を、また横軸はエフェクター細胞 (E) とターゲット細胞 (T) の比率E/Tを示す。多重改変ペプチドで誘導されたエフェクター細胞のRERF-LC-AI細胞に対する傷害性を黒丸、LK87細胞に対する傷害性を黒三角、11-18細胞に対する傷害性を黒四角で示す。天然型ペプチドで誘導されたエフェクター細胞のRERF-LC-AI細胞に対する傷害性を中空丸、LK87細胞に対する傷害性を中空三角、11-18細胞に対する傷害性を中空四角で示す。

図 2 5 は、ペプチドHでHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸は傷害活性 (% Specific Lysis) を示し、横軸はE/T比を示す。また黒丸はペプチドH (免疫ペプチド) をパルスした標的細胞を用いた結果を、白丸はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

図 2 6 は、ペプチドMでHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、黒丸および白丸は図 2 5 におけると同義である。

図 2 7 は、ペプチド N で HLA-A24 発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的 CTL が誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、黒丸および白丸は図 2 5 におけると同義である。

5 図 2 8 は、ペプチド O で HLA-A24 発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的 CTL が誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、黒丸および白丸は図 2 5 におけると同義である。

10 図 2 9 は、置換型ペプチド M によって誘導されたエフェクター細胞の非置換型ペプチド H に対する交差反応性を試験した結果を示したグラフである。図中、縦軸は CTL 誘導活性 (% Specific Lysis) を、また横軸は E/T 比を示す。また図中、黒丸はペプチド M (免疫ペプチド) をパルスした標的細胞を用いた結果を、黒四角はペプチド H をパルスした標的細胞を用いた結果を、また白丸はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

15 図 3 0 は、置換型ペプチド N によって誘導されたエフェクター細胞の非置換型ペプチド H に対する交差反応性を試験した結果を示したグラフである。図中、縦軸、横軸、黒丸、黒四角および白丸は図 2 9 におけると同義である。

発明を実施するための最良の形態

#### (I) 本発明のペプチド

20 本発明のペプチドは、ヒト WT 1 (Cell., 60:509, 1990、NCBI データベース Accession No. XP\_034418、配列番号: 1) に由来し、イン・ビボで HLA-A 24 拘束性の CTL 誘導活性 (免疫原性) を有する。

25 本発明のペプチドは、抗原提示細胞に提示されて、イン・ビボにて HLA-A 24 抗原拘束性に CTL を誘導するという特性を有する。当該特性は、後述の参考例に詳細に記述される HLA-A 24 モデルマウスを用いることにより調べることができる。

配列番号: 2、3、4、5 および 6 のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含む本発明ペプチドは、本発明ペプチド由来の癌抗原ペプチドが抗原提示細胞に提示され、CTL を誘導するという特性を有する限り、何ら制限されないが、その長さは通常 9~100 個、好ましくは 9~50 個、より好ましくは 9~30 個、さらに

好ましくは9～20個、そしてさらに好ましくは9～11個のアミノ酸残基である。ここに、癌抗原ペプチドとは、抗原提示細胞に提示される、CTL誘導活性を導くペプチドとして定義される。

本発明ペプチドは、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて合成することができる。合成方法としては、文献（ペプタイド・シンセシス (Peptide Synthesis) , Interscience, New York, 1966 ; ザ・プロテインズ (The Proteins) , Vol 2 , Academic Press Inc. , New York, 1976 ; ペプチド合成, 丸善 (株) , 1975 ; ペプチド合成の基礎と実験、丸善 (株) , 1985 ; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991) などに記載されている方法が挙げられる。

また本発明のペプチドは、本発明ペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列情報に基づいて、通常のDNA合成および遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。当該DNA合成や各種プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養および培養物からのタンパク質の回収などの操作は、当業者に周知の方法、文献記載の方法 (Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983)、DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985))、あるいは後述の (I I) 項に記載の方法などに準じて行うことができる。

以下、本発明のペプチドについてより具体的に説明する。

(1) 配列番号：2～6のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド

本発明は前述のように、配列番号：2～6に示されるWT 1由来の改変型ペプチドが、イン・ビボにてCTL誘導活性を有するという新たな知見を得たことに基づく。配列番号：2～6に示される新規なペプチドがイン・ビボにおいてCTL誘導活性を確かに示すという知見は、従来知られていなかった。これら改変型ペプチドのいずれかを含む本発明のペプチドは、癌免疫療法におけるCTL誘導剤の有効成分として、また癌ワクチンの有効成分として有用である。

本発明のペプチドは、具体的には以下のアミノ酸配列：

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：2)、

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：3)、

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：4)、  
Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：5) または  
Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号：6) のいずれかを含む。

5 このうちArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：4) を含むペプチドおよび Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：5) を含むペプチドが、好ましい。

本発明のペプチドとして、より具体的には以下の(1-1)～(1-4)に挙げるペプチドを例示することができる。

10 (1-1) 配列番号：2～6のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチド

配列番号：2～6のいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドの具体例として、以下に示す癌抗原ペプチドを例示することができる：

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：2)からなる癌抗原ペプチド、  
Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：3)からなる癌抗原ペプチド、  
15 Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：4)からなる癌抗原ペプチド、  
Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：5)からなる癌抗原ペプチド、  
Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号：6)からなる癌抗原ペプチド。

20 このうちArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：4) からなる癌抗原ペプチドおよび Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：5) からなる癌抗原ペプチドが、好ましい。これらのペプチドは、前述のように一般的なペプチド合成法によって製造することができる。また、本発明の参考例に記述のヒトモデル動物に供することによりイン・ビボでのCTL誘導活性を測定することができる。

25 (1-2) 配列番号：2～6のいずれかのアミノ酸配列を含み、モチーフ構造を保持するペプチド

HLA分子には多くのサブタイプが存在し、結合できる抗原ペプチドのアミノ酸配列にはそれぞれのタイプについて規則性(結合モチーフ)が存在することが知られている。HLA-A24の結合モチーフとしては、8～11アミノ酸からなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン(Tyr)、フェニルアラニン

(Phe)、メチオニン (Met) またはトリプトファン (Trp) であり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン(Phe)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)、トリプトファン(Trp)またはメチオニン(Met)となることが知られている (J. Immunol., 152, p3913, 1994、Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155, p4307, 1994)。

従ってこの規則性に基づいて、以下に示される9アミノ酸からなる本発明の癌抗原ペプチド：

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：2)、

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：3)、

10 Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：4)、

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：5)、または

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号：6)、

のC末端に、Phe、Leu、Ile、TrpまたはMetを付加した10アミノ酸からなるペプチド、あるいは当該10アミノ酸からなるペプチドのC末端にさらにPhe、Leu、Ile、TrpまたはMetを付加した11アミノ酸からなるペプチドであって、イン・ビボにてCTL誘導活性を有する当該ペプチドも、本発明のペプチドの具体例として例示できる。これらのペプチドも、前述のように一般的なペプチド合成法によって製造することができる。また、本発明の参考例に記述のヒトモデル動物に供することにより、イン・ビボでのCTL誘導活性を測定することができる。

20 (1-3) 配列番号：2～6のいずれかのアミノ酸配列を含むエピトープペプチド

近年、複数のCTLエピトープ (抗原ペプチド) を連結したペプチド (エピトープペプチド) が、イン・ビボで効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1998, 161: 3186-3194には、癌抗原タンパク質PSA由来のHLA-A2、-A3、-A11、B53拘束性CTLエピトープを連結した約30merのペプチドが、イン・ビボでそれぞれのCTLエ

25 ピトープに特異的なCTLを誘導したことが記載されている。

またCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたペプチド (エピトープペプチド) により、効率的にCTLが誘導されることも示されている。ここでヘルパーエピトープとはCD4陽性T細胞を活性化させる作用を有するペプチ

ドを指すものであり (Immunity., 1:751, 1994)、例えばB型肝炎ウイルス由来のHBV c 1 2 8 - 1 4 0や破傷風毒素由来のTT 9 4 7 - 9 6 7などが知られている。当該ヘルパーエピトープにより活性化されたCD4陽性T細胞は、CTLの分化の誘導や維持、およびマクロファージなどのエフェクター活性化などの作用を発揮するため、抗腫瘍免疫応答に重要であると考えられている。このよう

5      なヘルパーエピトープとCTLエピトープとを連列したペプチドの具体例として、例えばJournal of Immunology 1999, 162: 3915-3925には、HBV由来HLA-A 2拘束性抗原ペプチド6種類、HLA-A 1 1拘束性抗原ペプチド3種類、およびヘルパーエピトープより構成されるペプチドをコードするDNA (ミニジーン)

10      が、イン・ビボでそれぞれのエピトープに対するCTLを効果的に誘導したことが記載されている。また実際に、CTLエピトープ (メラノーマ抗原gp100の第280位~288位からなる癌抗原ペプチド) とヘルパーエピトープ (破傷風毒素由来Tヘルパーエピトープ) とを連結したペプチドが臨床試験に供されている

(Clinical Cancer Res., 2001, 7:3012-3024)。

15      従って、前記(1-1)や(1-2)に記述したような本発明の癌抗原ペプチドやペプチドを含む複数のエピトープを連結したペプチド (エピトープペプチド) であってイン・ビボでCTL誘導活性を有するペプチドも、本発明のペプチドの具体例として例示することができる。

本発明の癌抗原ペプチドに連結させるエピトープがCTLエピトープの場合、

20      用いるCTLエピトープとしては、WT 1由来のHLA-A1, -A0201, -A0204, -A0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602などに拘束性のCTLエピトープが挙げられる。これらCTLエピトープは複数個連結することが可能であり、1つのCTLエピトープの長さとしては、各種HLA分子に結合している抗原ペプチドの解析により

25      (Immunogenetics, 41:178, 1995)、8~14アミノ酸程度を挙げることができる。

また本発明の癌抗原ペプチドに連結させるエピトープがヘルパーエピトープの場合、用いるヘルパーエピトープとしては、前述のようなB型肝炎ウイルス由来のHBV c 1 2 8 - 1 4 0や破傷風毒素由来のTT 9 4 7 - 9 6 7などが挙げら



れる。また当該ヘルパーエピトープの長さとしては、13～30アミノ酸程度、好ましくは13～17アミノ酸程度を挙げることができる。

本発明のエピトープペプチドとして、より具体的には、例えば配列番号：2～6のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上とヘルパーエピトープとを連結させたペプチドを挙げることができる。より具体的には、例えば配列番号：2～6のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上と破傷風毒素由来のヘルパーペプチド（例えばPhe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu;配列番号：32）とを連結させたペプチドや、配列番号：2～6のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上とAla Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu（配列番号：50、Clinical Cancer Res., 2001, 7:3012-3024）とを連結させたペプチドなどが挙げられる。

このような複数のエピトープを連結させたペプチド（エピトープペプチド）は、前述のように一般的なペプチド合成法によって製造することができる。またこれら複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列情報に基づいて、通常のDNA合成および遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。すなわち、当該ポリヌクレオチドを周知の発現ベクターに挿入し、得られた組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換して作製された形質転換体を培養し、培養物より目的の複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドを回収することにより製造することができる。これらの手法は、前述のように文献記載の方法(Molecular Cloning, T.Maniatis et al., CSH Laboratory (1983)、DNA Cloning, DM.Glover, IRL PRESS(1985))や後述の(11)項に記載の方法などに準じて行うことができる。

以上のようにして製造された複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドを本発明の参考例に記述のヒトモデル動物に供することにより、イン・ビボでのCTL誘導活性を測定することができる。

(1-4) 配列番号：2～6のいずれかのアミノ酸配列を含み、N末端アミノ酸のアミノ基またはC末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾したペプチド

前記(1-1)～(1-3)に例示した本発明のペプチドのN末端アミノ酸のアミノ基、

またはC末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾することも可能である。

ここでN末端アミノ酸のアミノ基の修飾基としては、例えば1～3個の炭素数1から6のアルキル基、フェニル基、シクロアルキル基、アシル基が挙げられる。アシル基の具体例としては炭素数1から6のアルカノイル基、フェニル基で置換された炭素数1から6のアルカノイル基、炭素数5から7のシクロアルキル基で置換されたカルボニル基、炭素数1から6のアルキルスルホニル基、フェニルスルホニル基、炭素数2から6のアルコキシカルボニル基、フェニル基で置換されたアルコキシカルボニル基、炭素数5から7のシクロアルコキシで置換されたカルボニル基、フェノキシカルボニル基等が挙げられる。

C末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾したペプチドとしては、例えばエステル体およびアミド体が挙げられ、エステル体の具体例としては、炭素数1から6のアルキルエステル、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキルエステル、炭素数5から7のシクロアルキルエステル等が挙げられ、アミド体の具体例としては、アミド、炭素数1から6のアルキル基の1つまたは2つで置換されたアミド、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキル基の1つまたは2つで置換されたアミド、アミド基の窒素原子を含んで5から7員環のアザシクロアルカンを形成するアミド等が挙げられる。

(2) 配列番号：2～6のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含むペプチド（多重改変ペプチド）

前述のように本発明は、配列番号：2～6に示されるWT 1由来の改変型ペプチドが、イン・ビボでCTL誘導活性を有するという新たな知見を基礎とする。このようなイン・ビボでのCTL誘導活性を有するペプチドのアミノ酸配列をさらに改変することにより、同等またはそれ以上のCTL誘導活性を有するさらなる多重改変ペプチドを得ることができる。従って本発明においては、このような配列番号：2～6のいずれかに示されるペプチドの改変アミノ酸配列を含むペプチド（以下、多重改変ペプチドと称することもある）を提供する。

すなわち本発明は、配列番号：2、3、4、5および6のいずれかに記載のアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み、かつCTL誘導活性を有するペプチドを提供するものである。ただし、配列番号7のア

ミノ酸配列を有するペプチドは本発明のペプチドの範囲から除外される。

本発明におけるアミノ酸残基の「改変」とは、1個または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、および/または付加を意味し、好ましくは置換である。アミノ酸残基の置換に係る改変の場合、置換されるアミノ酸残基の位置および種類は、イン・ビボでのCTL誘導活性を保持する限り特に限定されない。このような改変アミノ酸配列を含むペプチドの具体例として、以下に挙げるペプチドが例示される。

前述のように、HLA-A24の結合モチーフとして、8～11アミノ酸からなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン (Tyr)、フェニルアラニン (Phe)、メチオニン (Met) またはトリプトファン (Trp) であり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン (Phe)、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、トリプトファン (Trp) またはメチオニン (Met) となることが知られている (J. Immunol., 152, p3913, 1994、Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155, p4307, 1994)。よって、本発明における多重改変ペプチドでは、配列番号：2～6のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列の第2位および/または第9位のアミノ酸残基を、前記モチーフ上とり得るアミノ酸残基に置換することが可能である。

具体的に第2位のアミノ酸の多重改変ペプチドとしては、以下に列挙するアミノ酸配列を含みかつイン・ビボでCTL誘導活性を有するペプチドを挙げることができる：

Arg Phe Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：53)、  
Arg Trp Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：54)、  
Arg Phe Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：55)、  
Arg Met Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：56)、  
Arg Trp Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：57)、  
Arg Phe Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：58)、  
Arg Met Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：59)、  
Ala Phe Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：60)、  
Ala Met Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：61)、

Ala Trp Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：62)、  
Asn Phe Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号：63)、  
Asn Met Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号：64)、  
Asn Trp Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号：65)。

- 5       ここには、前記配列番号：53～65のいずれかに記載のアミノ酸配列からなりかつイン・ビボでCTL誘導活性を有する癌抗原ペプチドが包含される。

本発明の配列番号：2～6に示されるペプチドは、いずれも、ヒトWT1由来の天然型ペプチドの第2位のアミノ酸をチロシンに改変することにより良好なCTL誘導活性を有するに至った改変型ペプチドである。よって、本発明の多重改変ペプチドは、当該第2位のアミノ酸がチロシンであることが望ましい。一方C末端のアミノ酸については、前記のモチーフ上とり得るアミノ酸に改変することが可能である。

- 10       この態様における本発明の多重改変ペプチドとして、以下に列挙するアミノ酸配列を含みかつイン・ビボでCTL誘導活性を有するペプチドを挙げることができ  
15       きる：

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Phe (配列番号：12)、  
Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Trp (配列番号：13)、  
Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Ile (配列番号：14)、  
Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Met (配列番号：15)、  
20       Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Phe (配列番号：16)、  
Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Trp (配列番号：17)、  
Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Ile (配列番号：18)、  
Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Met (配列番号：19)、  
Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Trp (配列番号：20)、  
25       Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Leu (配列番号：21)、  
Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Ile (配列番号：22)、  
Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Met (配列番号：23)、  
Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Phe (配列番号：24)、  
Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Trp (配列番号：25)、

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Ile (配列番号：26)、  
Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Met (配列番号：27)、  
Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Phe (配列番号：28)、  
Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Trp (配列番号：29)、  
5 Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Ile (配列番号：30)、  
Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Met (配列番号：31)。

これには、前記配列番号：12～31のいずれかに記載のアミノ酸配列からなりかつイン・ビボでCTL誘導活性を有する癌抗原ペプチドが含まれる。

さらに、上記第2位のアミノ酸の多重改変ペプチドにおける第2位のアミノ酸  
10 の改変と、ここに記載のC末端のアミノ酸の改変とを併せ持つ癌抗原ペプチドも  
例示することができる。

また、配列番号：4に記載のアミノ酸配列中にはシステイン残基が存在し、それは溶液中にて酸化されてジスルフィド結合を生じる可能性がある。これを避けるには、当該システイン残基を他のアミノ酸残基、例えばアラニン残基やセリン  
15 残基などに置換したり、システイン残基と化学構造の類似する $\alpha$ -アミノ酪酸に  
置換し、多重改変ペプチドとすることが考えられる。

この態様における本発明の多重改変ペプチドとして、以下に列挙するアミノ酸配列を含みかつイン・ビボでCTL誘導活性を有するペプチドを挙げることができる：

20 Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe (配列番号：66)、  
Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe (配列番号：67)、  
Arg Tyr Pro Ser Abu Gln Lys Lys Phe (配列番号：68) [ここに、Abuは $\alpha$ -アミノ酪酸である]。

これには、前記配列番号：66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなりかつイン・ビボでCTL誘導活性を有する癌抗原ペプチドが含まれる。  
25

これらのペプチドは、前述のように一般的なペプチド合成法によって製造することができる。また、本発明の参考例に記載のヒトモデル動物に供することによりイン・ビボでのCTL誘導活性を測定することができる。

以上述べた本発明の多重改変ペプチドに関しても、前記(1-2)と同様のモチ

ープ構造を保持するペプチド、前記(1-3)と同様の複数のエピトープを連結させたペプチド、あるいは前記(1-4)と同様のアミノ基もしくはカルボキシル基を修飾したペプチドとすることができる。

5 以上のような本発明のペプチドは、例えば、後述するCTLの誘導剤、癌ワクチンの有効成分として、また後述する抗原提示細胞の作製において、有効に用いることができる。

#### (I I) 本発明のポリヌクレオチド、発現ベクター、および形質転換細胞

10 本発明はまた、前記本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドは、DNAの形態であってもRNAの形態であっても良い。これら本発明のポリヌクレオチドは、本発明のペプチドのアミノ酸配列情報およびそれによりコードされるDNAの配列情報に基づき容易に製造することができる。具体的には、通常のDNA合成やPCRによる増幅などによって、製造することができる。

15 このような本発明のポリヌクレオチドとしては、以下に示すポリヌクレオチドが例示される：

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：2) を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド、

20 Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：3) を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド、

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：4) を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド、

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：5) を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド、

25 Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号：6) を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド、

Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe (配列番号：66) を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド、

Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe (配列番号：67) を含むペプチドをコ

ードするポリヌクレオチド、

Arg Tyr Pro Ser Abu Gln Lys Lys Phe (配列番号：68) [ここに、Abuは $\alpha$ -アミノ酪酸である]を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド。

具体的には、例えば前記(1-3)に記述したような配列番号：2～6および66～68のいずれかのアミノ酸配列を含むエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。より具体的には、例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上とヘルパーペプチドとを連結させたペプチドをコードするポリヌクレオチドを挙げることができ、例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上と破傷風毒素由来のヘルパーペプチド (例えばPhe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu;配列番号：32) とを連結させたペプチドをコードするポリヌクレオチドや、配列番号：2～6および66～68のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上とAla Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu (配列番号：50、Clinical Cancer Res., 2001, 7:3012-3024) とを連結させたペプチドをコードするポリヌクレオチドを挙げることができる。

前記で作製された本発明のポリヌクレオチドを発現ベクターに組み込むことにより、本発明のペプチドを発現するための組換え発現ベクターを作製することができる。

ここで用いる発現ベクターとしては、用いる宿主や目的等に応じて適宜選択することができ、プラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター等が挙げられる。

例えば、宿主が大腸菌の場合、ベクターとしては、pUC118、pUC119、pBR322、pCR3等のプラスミドベクター、 $\lambda$  ZAPII、 $\lambda$  gt11などのファージベクターが挙げられる。宿主が酵母の場合、ベクターとしては、pYES2、pYEUra3などが挙げられる。宿主が昆虫細胞の場合には、pAcSGHisNT-Aなどが挙げられる。宿主が動物細胞の場合には、pKCR、pCDM8、pGL2、pcDNA3.1、pRc/RSV、pRc/CMVなどのプラスミドベクターや、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクターなどのウイルスベクターが挙げられる。

前記ベクターは、発現誘導可能なプロモーター、シグナル配列をコードする遺伝子、選択用マーカー遺伝子、ターミネーターなどの因子を適宜有していても良い。

また、単離精製が容易になるように、チオレドキシン、Hisタグ、あるいはGST  
(グルタチオンS-トランスフェラーゼ) 等との融合タンパク質として発現する配  
列が付加されていても良い。この場合、宿主細胞内で機能する適切なプロモーター  
(lac、tac、trc、trp、CMV、SV40初期プロモーターなど) を有するGST融合タン  
パク質を発現するベクター (pGEX4Tなど) や、Myc、Hisなどのタグ配列を有す  
るベクター (pcDNA3.1/Myc-Hisなど) 、さらにはチオレドキシンおよびHisタグ  
との融合タンパク質を発現するベクター (pET32a) などを用いることができる。

以上のような本発明のポリヌクレオチドまたはそれを含有する発現ベクターを  
本発明の参考例に記述のヒトモデル動物に供することにより、イン・ビボでのC  
TL誘導活性を測定することができる。

本発明のポリヌクレオチドまたはそれを含有する発現ベクターは、例えば、後  
述する本発明のペプチドの製造において、後述する遺伝子治療において、また後  
述する抗原提示細胞の作製において、有効に用いることができる。

前記で作製された発現ベクターで宿主を形質転換することにより、当該発現ベ  
クターを含有する形質転換細胞を作製することができる。

ここで用いられる宿主としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙  
げられる。大腸菌としては、E. coli K-12系統のHB101株、C600株、JM109株、DH5  
α株、AD494 (DE3) 株などが挙げられる。また酵母としては、サッカロミセス・セ  
ルビジエなどが挙げられる。動物細胞としては、L929細胞、BALB/c3T3細胞、  
C127細胞、CHO細胞、COS細胞、Vero細胞、Hela細胞などが挙げられる。昆虫細胞  
としてはsf9などが挙げられる。

宿主細胞への発現ベクターの導入方法としては、前記宿主細胞に適合した通常  
の導入方法を用いれば良い。具体的にはリン酸カルシウム法、DEAE-デキストラ  
ン法、エレクトロポレーション法、遺伝子導入用リピッド (Lipofectamine、  
Lipofectin; Gibco-BRL社) を用いる方法などが挙げられる。導入後、選択マー  
カーを含む通常の培地にて培養することにより、前記発現ベクターが宿主細胞中



に導入された形質転換細胞を選択することができる。

以上のようにして得られた形質転換細胞を好適な条件下で培養することにより、本発明のペプチドを製造することができる。得られたポリペプチドは一般的な生化学的精製手段により、さらに単離・精製することができる。ここで精製手段としては、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等が挙げられる。また本発明のポリペプチドを、前述のチオレドキシシンやHisタグ、GST等との融合タンパク質として発現させた場合は、これら融合タンパク質やタグの性質を利用した精製法により単離・精製することができる。

#### ( I I I ) 本発明の抗体

本発明は、本発明のペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。本発明の抗体は、その形態に特に制限はなく、本発明のペプチドを免疫抗原とするポリクローナル抗体であっても、またモノクローナル抗体であっても良い。

本発明の抗体は前記のように本発明のペプチドに特異的に結合するものであれば特に制限されないが、具体的には、配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドに特異的に結合する抗体を挙げることができる。

これらの抗体の製造方法はすでに周知であり、本発明の抗体もこれらの常法に従って製造することができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.12～11.13、Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H, D.ら編, Cold Spring Harbor Laboratory Press 出版 New York 1989)。

具体的には、本発明のペプチド (例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド) を免疫原として用い、家兎等の非ヒト動物を免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、本発明のペプチド (例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド) をマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞

とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から得ることができる

(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987)

Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4~11.11)。

本発明のペプチドに対する抗体の作製は、宿主に応じて種々のアジュバントを用いて免疫学的反応を高めることによって行うこともできる。そのようなアジュバントには、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、並びにリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニンおよびジニトロフェノールのような表面活性物質、BCG（カルメットーゲラン桿菌）やコリネバクテリウム・パルヴムなどのヒトアジュバントなどがある。

以上のように本発明のペプチドを用いて常法により適宜動物を免疫することにより、ペプチドを認識する抗体、さらにはその活性を中和する抗体が容易に作製できる。抗体の用途としては、アフィニティークロマトグラフィー、免疫学的診断等が挙げられる。免疫学的診断は、イムノブロット法、放射免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（ELISA）、蛍光あるいは発光測定法等より適宜選択できる。このような免疫学的診断は、WT1遺伝子が発現している癌、すなわち胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の診断において有効である。

#### （I V）本発明の抗原提示細胞

本発明は、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体の提示された抗原提示細胞を提供する。

後述の実施例において、本発明のペプチド投与によりCTL誘導活性が認められたが、これは、末梢血単核球中に、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体の提示された抗原提示細胞が存在し、そして、この複合体の提示された癌細胞を特異的に傷害するCTLが誘導されたことを示している。このような、HLA-A24抗原と本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞は、後述する細胞療法（DC療法）において有効に用いられる。

本発明の抗原提示細胞は、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A 2 4抗原との複合体が提示された抗原提示細胞であれば良いが、好ましくは、例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドとHLA-A 2 4抗原との複合体が樹状細胞の細胞表面に提示された抗原提示細胞を挙げることができる。

細胞療法において用いられる抗原提示細胞は、癌患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、この細胞に本発明のペプチドを体外でパルスするか、または本発明のポリヌクレオチドやそれを含有する発現ベクターを細胞内に導入して、HLA-A 2 4抗原と本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとの複合体を細胞表面に提示させることにより作製される。ここで「抗原提示能を有する細胞」とは、本発明のペプチドを提示可能なHLA-A 2 4抗原を細胞表面に発現している細胞であれば特に限定されないが、抗原提示能が高いとされている樹状細胞が好ましい。

また、前記抗原提示能を有する細胞にパルスされるものとしては、本発明のペプチドであっても良いし、また本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドやそれを含有する発現ベクターであっても良い。

本発明の抗原提示細胞は、例えば癌患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、該細胞に本発明のペプチド（例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド）を体外でパルスし、HLA-A 2 4抗原と本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとの複合体を作製することにより得られる(Cancer Immunol. Immunother., 46:82, 1998、J. Immunol., 158: p1796, 1997、Cancer Res., 59:p1184, 1999)。樹状細胞を用いる場合は、例えば、癌患者の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離し、その後非付着細胞を除き、付着細胞をGM-CSFおよびIL-4存在下で培養して樹状細胞を誘導し、当該樹状細胞を本発明のペプチドと共に培養してパルスすることなどにより、本発明の抗原提示細胞を調製することができる。

また、前記抗原提示能を有する細胞に本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載の配列を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド）あるいはそれを含有する発現ベク

ターを導入することにより本発明の抗原提示細胞を調製する場合は、当該ポリヌクレオチドがDNAの場合は、Cancer Res., 56:p5672, 1996や J. Immunol., 161:p5607, 1998などを参考にして行うことができる。また、DNAのみならずRNAの形態でも同様に抗原提示細胞を調製することができ、この場合は、J. Exp. Med., 184: p465, 1996などを参考にして行うことができる。

以上のようにして作製された本発明の抗原提示細胞は、後述するCTLの誘導剤、癌ワクチンの有効成分として、あるいは細胞療法（DC療法）において有効に用いられる。

#### (V) 本発明のCTL

本発明は、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を認識するCTLを提供する。

後述の実施例において、本発明のペプチド投与によりCTL誘導活性が認められたが、これは、末梢血単核球中に、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体の提示された抗原提示細胞が存在し、そして、この複合体の提示された癌細胞を特異的に傷害するCTLが誘導されたことを示している。このような、HLA-A24抗原と本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLは、後述する養子免疫療法において有効に用いられる。

本発明のCTLは、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を特異的に認識するものであれば良いが、具体的には、例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を特異的に認識するCTLを挙げることができる。

養子免疫療法において用いられるCTLは、患者の末梢血リンパ球を単離し、これを本発明のペプチド（例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド）、あるいは本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載の配列を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド）やそれを含有

する発現ベクターでイン・ビトロで刺激する等により作製される (Journal of Experimental Medicine 1999, 190: 1669)。

以上のようにして作製された本発明のCTLは、癌ワクチンの有効成分として、あるいは養子免疫療法において有効に用いられる。

5

#### (V I) 癌ワクチンとしての医薬組成物、使用および方法

以上に記載した本発明のペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明の発現ベクター、本発明の抗原提示細胞、および本発明のCTLは、それぞれの物質に応じた適切な形態とすることにより、CTLの誘導剤、すなわち癌ワクチンの有効成分とすることができる。以下、具体的に説明する。

10

#### (6-1) 本発明のペプチドを有効成分とする癌ワクチン

本発明のペプチドは、CTLの誘導活性を有しており、誘導されたCTLは、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗癌作用を発揮することができる。従って本発明のペプチドは、癌の治療または予防のための癌ワクチンの有効成分とすることができる。すなわち本発明は、本発明のペプチドを有効成分として含有する癌ワクチン（癌ワクチンとしての医薬組成物）を提供する。本発明の癌ワクチンをHLA-A 2 4 陽性かつWT 1 陽性の患者に投与すると、抗原提示細胞のHLA-A 2 4 抗原にペプチド（例えば配列番号：2～6 および66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド）が提示され、提示されたHLA-A 2 4 抗原複合体特異的CTLが増殖して癌細胞を破壊することができ、従って、癌の治療または予防が可能となる。本発明の癌ワクチンは、WT 1 遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の治療または予防のために使用することができる。

15

20

25

よって、本発明は別の態様として、本発明の癌ワクチン製造のための使用、および本発明の癌ワクチンの有効量をHLA-A 2 4 陽性かつWT 1 陽性の患者に投与することにより、癌を治療または予防するための方法を提供する。

本発明のペプチドを有効成分とする癌ワクチンは、単一のCTLエピトープを

有効成分とするものであっても、また他のペプチド（CTLエピトープやヘルパーエピトープ）と連結したエピトープペプチドを有効成分とするものであっても良い。すなわち近年、複数のCTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結したエピトープペプチドが、イン・ビボで効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1998, 161: 3186-3194には、癌抗原タンパク質PSA由来のHLA-A2, -A3, -A11, B53拘束性CTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結した約30merのエピトープペプチドが、イン・ビボでそれぞれのCTLエピトープに特異的なCTLを誘導したことが記載されている。またCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたエピトープペプチドにより、効率的にCTLが誘導されることも示されている。このようなエピトープペプチドの形態で投与した場合、抗原提示細胞内に取り込まれ、その後、細胞内分解を受けて生じた個々の抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体に特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、癌細胞を破壊する。このようにして癌の治療または予防が達成される。

また本発明のペプチドを有効成分とする癌ワクチンは、細胞性免疫が効果的に成立するように、医薬として許容されるキャリアー、例えば適当なアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献（Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994）に記載のものなどが応用可能であり、具体的には、菌体由来成分、サイトカイン、植物由来成分、水酸化アルミニウム如き鉱物ゲル、リソレシチン、プルロニックポリオールの如き界面活性剤、ポリアニオン、ペプチド、または油乳濁液（エマルジョン製剤）などを挙げるができる。また、リポソーム製剤、直径数 $\mu\text{m}$ のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。

投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与などが挙げられる。製剤中の本発明のペプチドの投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～1000mg、より好ましくは0.1mg～10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

(6-2) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド、または発現ベクターを有効成分とするDNAワクチン

前記本発明のペプチドのみならず、当該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびそれを含有する発現ベクターもまた、癌の治療または予防のためのDNAワクチンの有効成分とすることができる。すなわち本発明は、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド、または当該ポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを有効成分として含有する癌ワクチン（癌ワクチンとしての医薬組成物）を提供する。また、本発明は別の態様として、本発明のDNAワクチンの有効量をHLA-A24陽性かつWT1陽性の患者に投与することにより、癌を治療または予防するための方法を提供する。

近年、複数のCTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結したエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチド、あるいはCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが、*in vivo*で効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1999, 162: 3915-3925には、HBV由来HLA-A2拘束性抗原ペプチド6種類、HLA-A11拘束性抗原ペプチド3種類、およびヘルパーエピトープを連結したエピトープペプチドをコードするDNA（ミニジーン）が、*in vivo*でそれぞれのエピトープに対するCTLを効果的に誘導したことが記載されている。

従って、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを1種または2種以上連結させることにより、また場合によっては他のペプチドをコードするポリヌクレオチドも連結させることにより作製されたポリヌクレオチドを、適当な発現ベクターに組み込むことにより、癌ワクチンの有効成分とすることができる。

本発明のポリヌクレオチドを癌ワクチン（DNAワクチン）の有効成分として適用する際には、以下の方法が使用され得る。

すなわち、本発明のポリヌクレオチドを細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、およびこれらの引用文献等）のいずれの方法も適用することができる。

ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイル

ス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

本発明のポリヌクレオチドを実際に医薬として作用させるには、当該ポリヌクレオチドを直接体内に導入する *in vivo*法、およびヒトからある種の細胞を採集し体外でDNAを該細胞に導入しその細胞を体内に戻す *ex vivo*法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、およびこれらの引用文献等）。*in vivo*法がより好ましい。

*in vivo*法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。*in vivo*法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である本発明のポリヌクレオチドを含有する注射剤等とされ、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。また、本発明のポリヌクレオチドを含有するリポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（HVJ）-リポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができる。

製剤中の本発明のポリヌクレオチドの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常、0.0001mg～100mg、好ましくは0.001mg～10mgの本発明のポリヌクレオチドを、数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

以上のような本発明のポリヌクレオチドの癌患者への投与により、抗原提示細胞内で当該ポリヌクレオチドに対応するポリペプチドが高発現する。その後、細



胞内分解を受けて生じた個々の癌抗原ペプチドがH L A抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体特異的なC T Lが体内で効率的に増殖し、癌細胞を破壊する。以上のようにして、癌の治療または予防が達成される。本発明のポリヌクレオチドまたは当該ポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを有効成分とする癌ワクチンは、WT 1 遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の治療または予防のために使用することができる。

(6-3) 本発明の抗原提示細胞を有効成分とする癌ワクチン

本発明は、本発明の抗原提示細胞を有効成分とする癌ワクチンを提供する。

近年、癌患者の末梢血からリンパ球を分離し、その中から樹状細胞を誘導し、イン・ビトロでペプチド等をパルスして調製した抗原提示細胞を皮下投与などにより患者に戻す細胞療法（DC療法）が報告されている（Cancer Immunol.

Immunother., 46: 82, 1998、J. Immunol., 158: p1796, 1997、Cancer Res., 59: p1184, 1999、Cancer Res., 56: p5672, 1996、J. Immunol., 161: p5607, 1998、J. Exp. Med., 184: p465, 1996）。従って前記本発明の抗原提示細胞を、細胞療法における癌ワクチンの有効成分として使用することができる。

本発明の抗原提示細胞を有効成分とする癌ワクチンは、抗原提示細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。また投与量は、前記文献記載の投与量が例示される。

前記癌ワクチンを患者の体内に戻すことにより、H L A-A 2 4 陽性かつWT 1 陽性の患者の体内で効率良く特異的なC T Lが誘導され、癌を治療または予防することができる。本発明の抗原提示細胞を有効成分とする癌ワクチンは、WT 1 遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の治療または予防のために使用することができる。

(6-4) 本発明のCTLを有効成分とする癌ワクチン

本発明は、本発明のCTLを有効成分とする癌ワクチン（癌ワクチンとしての医薬組成物）を提供する。本発明のCTLは、以下の養子免疫療法において有効に用いられる。

5       メラノーマにおいて、患者本人の腫瘍内浸潤T細胞を体外で大量に培養し、これを患者に戻す養子免疫療法に治療効果が認められている（J. Natl. Cancer. Inst., 86: 1159, 1994）。またマウスのメラノーマでは、脾細胞をイン・ビトロで癌抗原ペプチドTRP-2で刺激し、癌抗原ペプチドに特異的なCTLを増殖させ、該CTLをメラノーマ移植マウスに投与することにより、転移抑制が認められている（J. Exp. Med., 185: 453, 1997）。これは、抗原提示細胞のHLA抗原と癌抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLをイン・ビトロで増殖させた結果に基づくものである。従って、本発明のペプチドあるいは本発明のポリヌクレオチドや発現ベクターを用いて、イン・ビトロで患者末梢血リンパ球を刺激して癌特異的CTLを増やした後、このCTLを患者に戻す治療法は有用であると考えられる。従って前記本発明のCTLを、養子免疫療法における癌ワクチンの有効成分として使用することができる。

10

15

本発明のCTLを有効成分とする癌ワクチンは、CTLを安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。また投与量としては、前記文献記載の投与量が例示される。

20

前記癌ワクチンを患者の体内に戻すことにより、HLA-A24陽性かつWT1陽性の患者の体内でCTLによる癌細胞の傷害作用が促進され、癌細胞を破壊することにより、癌を治療することができる。本発明のCTLを有効成分とする癌ワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の治療または予防のために使用することができる。

25

(VII) 配列番号：7に記載のアミノ酸配列を含むペプチドに基づく癌ワクチ

ン

本発明において、アミノ酸配列：Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu（配列番号：7）を有するペプチドが、イン・ビボでCTL誘導活性を有することが見出された。当該配列番号：7に記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドは、

5 W000/18795号公報においてHLA-A24抗原への推定結合配列を有するペプチドとして開示されている。しかしながらイン・ビボでCTL誘導活性を有し、癌ワクチンとして利用可能であることは本発明において初めて見出された知見である。

従って本発明は、以下のa)～f)：

- 10 a) 配列番号：7に記載のアミノ酸配列を含むペプチド、  
b) 上記a)のペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
c) 上記b)のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、  
d) 上記c)の発現ベクターを含有する細胞、  
e) 上記a)のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体  
15 の提示された抗原提示細胞、および  
f) 上記a)のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を認識するCTL、

のなかから選ばれるいずれかを有効成分とする医薬組成物および癌ワクチンを提供する。また、本発明は、上記ペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクター、形

20 質転換細胞、抗原提示細胞あるいはCTLにおける癌ワクチンを製造するための使用、およびそれら発明の治療または予防に有効な量をそれを必要としている癌患者に投与する癌を治療または予防するための方法に関する。

当該a)～f)に記載の各物質の作製法、およびこれらの物質の癌ワクチンとしての用途については、全て、前記本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベ

25 クター、抗原提示細胞およびCTLの項に記述のとおりである。

#### 実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

以下の参考例は、HLA-A24抗原を発現するトランスジェニックマウスの作製に関するものであり、その詳細はWO 02/47474（国際公開日：2002年6月20日、PCT/JP01/10885（国際出願日：2001年12月12日（優先日：2000年12月13日）））に記載されている。

5

## 参考例 1

HLA-A2402ゲノムDNA断片のクローニング

## (1) HLA-A2402ゲノムDNA断片のクローニング

ヒトHLA-A2402ゲノムDNAをPCRクローニングするため、ヒト腫瘍細胞株RERF-LC-AI細胞（理研細胞バンク RCB0444）を培養し、Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation Kit（Amersham社製）を用い、添付のプロトコールに従い、ヒトゲノムDNAを精製した。次に、キメラHLA遺伝子の構築に必要なHLA-A2402ゲノムDNA配列についてGenBankデータベースにより調べたところ、Accession番号、Z72422が該当するものであったが、プロモーター領域（270bp）が登録されていないことが判明した。当該トランスジェニックマウスの作製には、プロモーター、エキソン1～3、およびイントロン1～3を必要とする。そこで、プロモーターを含むHLA-A2402ゲノムDNAのPCRクローニングにあたり、日本人に多いHLA-A2601のプロモーターの塩基配列（Accession番号、AB005048）を参考にHLA26-1F（5'-CCC AAG CTT ACT CTC TGG CAC CAA ACT CCA TGG GAT-3'，36mer、配列番号：36）を上流プライマーとし、またイントロン3に含まれる塩基配列の一部を改変したもの、すなわちAccession番号、Z72422の5'末より1282番目をGからAに改変したA24-Bgl II 30（5'-CGG GAG ATC TAC AGG CGA TCA GGT AGG CGC-3'，30mer、配列番号：37）を下流プライマーとして用いた。

ここで、当該塩基改変の理由は以下の通りである。すなわち、トランスジェニックマウスにおいて発現するキメラHLAが、エキソン1から3までをHLA-A2402、エキソン4から8までをH-2K<sup>b</sup>によって構成されることを目的としており、このようなキメラHLAを作製するために、HLA-A2402ゲノムDNA上流よりイントロン3にコードされる制限酵素Bam HI部位までとH-2K<sup>b</sup>ゲノムDNAのイントロン3より下流とを連結するため、HLA-A2402のイントロン3に人為的に制限酵素Bgl II部位を

25

構築する必要があったからである。

次に、3'→5'のエキソヌクレアーゼ活性の高いNative Pfu DNA Polymerase

(Stratagene社製)を用い、添付のプロトコールに従い、上記プライマーペアを用いてHLA-A2402ゲノムDNA断片のPCRクローニングを行った。PCRは95℃45秒で熱  
5 処理した後、95℃45秒、66℃1分、および72℃4分を35サイクル繰り返したのち、  
72℃で10分反応させ、その後4℃に冷却した。増幅遺伝子断片をファージミドベ  
クターpBluescriptの制限酵素Hind IIIおよびBam HI切断部位にライゲーション  
により連結して組み換えプラスミドを得た。この組み換えプラスミドを42℃のヒ  
ートショック法により大腸菌JM109（東洋紡社製）に導入し、X-GalおよびIPTGを  
10 塗布したアンピシリン（50 μg/ml）含有LB寒天培地（1%バクトトリプトン、0.5%  
イーストエキストラクト、1%NaCl、2%寒天）で組み換えプラスミドが導入されて  
いる白色の大腸菌コロニーを判別し、形質転換体を選択した。

#### （2）HLA-A2402プロモーター領域の塩基配列の決定

上記で得られた形質転換体の4個について、3mlのアンピシリン含有LB培地にて  
15 一晚培養したのち、各形質転換体が包含するプラスミドクローンをアルカリ溶解  
法（F.M.Ausubelら編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley  
& Sons, Inc.）により精製した。次に、ABI PRISM<sup>TM</sup> 377DNAシーケンシングシ  
ステム（PEバイオシステムズ社製）により塩基配列を解析した。シーケンス解析  
用サンプルは、ABI PRISM<sup>TM</sup> Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction  
20 キット（PEバイオシステムズ社製）を用いて、添付プロトコールに従い、各ク  
ローンのシーケンスを解析した。その結果、すべてのクローンについてプロモータ  
ー領域を比較すると完全に一致していたことより、GenBankデータベースに登録  
されていないHLA-A2402のプロモーター領域の塩基配列が決定された。また、  
Accession番号、Z72422の塩基配列と各クローンを比較したところ、PCR変異はみ  
25 られない正常な1個のクローンが存在していた。

## 参考例2

### H-2K<sup>b</sup> ゲノムDNA断片のクローニング

#### （1）H-2K<sup>b</sup> ゲノムDNA断片のクローニング

マウス腫瘍細胞株EL4細胞（ATCC T1B-39）を培養してマウスゲノムDNAを精製し、PCRクローニングに用いた。DNAの精製方法は、長鎖DNAの増幅に適する TaKaRa LA Taq<sup>TM</sup>（宝酒造社株式会社製）を用い、添付のプロトコールに従い実施した。次に、キメラHLA遺伝子の構築に必要なH-2K<sup>b</sup> 遺伝子配列について

5 GenBankデータベースにより調べたところ、2つに分断されて登録されていた。すなわち、Accession番号: v00746およびv00747である。v00746ではイントロン3の一部迄のH-2K<sup>b</sup> 上流をコードする1594bp領域が、一方、v00747ではイントロン7の一部迄のH-2K<sup>b</sup> 下流をコードする1837bp領域が登録されていた。v00746およびv00747により2つに分断されて登録されているイントロン3には制限酵素Bam  
10 HI部位が存在していなかったことにより、データベースに登録されているH-2K<sup>b</sup> 遺伝子は不完全長と推測された。

H-2K<sup>b</sup> 遺伝子には相同な偽遺伝子や相同性の高い遺伝子が存在している（Cell., 25:683, 1981）。そこで、当該相同遺伝子と相同性が低く且つv00746のエキソン3にコードされるH-2KB F3（5'-CGC AGG CTC TCA CAC TAT TCA GGT GAT CTC-3', 30mer、配列番号: 38）を上流プライマーとし、また v00747の末端に制限酵素  
15 Eco RI部位を付加したH-2KB 3R（5'-CGG AAT TCC GAG TCT CTG ATC TTT AGC CCT GGG GGC TC-3', 38mer、配列番号: 39）を下流プライマーとして、TaKaRa LA Taq<sup>TM</sup>（宝酒造社株式会社製）を用いて添付のプロトコールに従い、上記精製マウスゲノムDNAを鋳型にPCR反応を実施した。当該PCRは、98℃10秒および66℃4分  
20 25サイクル繰り返したのち、68℃で10分反応させ、その後4℃に冷却した。

増幅遺伝子断片をファージミドベクターpBluescriptの制限酵素Kpn IおよびEco RI切断部位にライゲーションにより連結して組み換えプラスミドを得た。この組み換えプラスミドを42℃のヒートショック法により大腸菌JM109（東洋紡社製）に導入し、X-GalおよびIPTGを塗布したアンピシリン含有LB寒天培地で組み  
25 換えプラスミドが導入されている白色の大腸菌コロニーを判別し、形質転換体を選択した。この形質転換体3個を3mlのアンピシリン含有LB培地にて一晚培養したのち、各形質転換体が包含する組み換えプラスミドクローンを精製し、シーケンスを解析した。方法は上記と同様にして行った。3つの当該クローンの塩基配列とv00747の塩基配列を比較したところ、2クローンでそれぞれ別々に1ヶ所の

PCR変異が、他方1クローンで3ヶ所のPCR変異がみられた。また、3クローン間では共通しているがv00747と異なる塩基が5ヶ所みられた。これら塩基はイントロン6と3'非翻訳領域に相当する領域にあった。更に、未登録のイントロン3領域においては、3クローン間で異なるPCR変異した塩基が1ヶ所みられた。これより、未登録領域の塩基配列部分を決定することができなかったため、3'→5'のエキソヌクレアーゼ活性の高いポリメラーゼを用いて未登録のイントロン3領域について再度クローニングを行い、塩基配列の決定を行った。

## (2) H-2K<sup>b</sup> イントロン3の塩基配列の決定

未登録領域の塩基配列を決定するため、Native Pfu DNA Polymerase

(Stratagene社製)を用い、添付のプロトコールに従い、上記精製マウスゲノムDNAを鋳型に未登録のイントロン3を含む領域についてPCRクローニングした。ここでは、v00746に登録されているH-2kb F5 (5'-AGG ACT TGG ACT CTG AGA GGC AGG GTC TT-3', 29mer、配列番号: 40) を上流プライマーとして用い、またv00747に登録されているH-2kb 5R (5'-CAT AGT CCC CTC CTT TTC CAC CTG TGA GAA-3', 30mer、配列番号: 41) を下流プライマーとして用いた。PCRは95°C45秒で熱処理した後、95°C45秒、68°C1分、および72°C4分を25サイクル繰り返したのち、72°Cで10分反応させ、その後4°Cに冷却した。増幅遺伝子断片をファージミドベクターpBluescriptの制限酵素Bam HIおよびBgl II切断部位にライゲーションにより連結して組み換えプラスミドを得た。この組み換えプラスミドを42°Cのヒートショック法により大腸菌JM109 (東洋紡社製) に導入し、X-GalおよびIPTGを塗布したアンピシリン含有LB寒天培地で組み換えプラスミドが導入されている白色の大腸菌コロニーを判別し、形質転換体を選択した。この形質転換体の5個について3mlのアンピシリン含有LB培地にて一晚培養したのち、各形質転換体が包含するプラスミドクローンを精製し、塩基配列を解析した。方法は上記と同様にして行った。その結果、解析したクローン間のイントロン3領域について比較すると、すべてのクローンで完全に一致していた。これよりイントロン3領域の塩基配列を決定することができた。未登録領域の制限酵素Bam HI部位よりv00747までは、463bpであることも判明した。

## (3) H-2K<sup>b</sup> ゲノムDNAの構築

前記（２）で未登録領域の塩基配列が決定されたことにより、目的とするキメラHLA遺伝子の構築に必要なH-2K<sup>b</sup> ゲノムDNAの全塩基配列が決定された。その結果、前記（１）で得られた２種類のクローン、すなわち5'末端側にPCR変異の無い１つのクローン（H-2K<sup>b</sup> #26）、および3'末端側にPCR変異の無い１つクローン

（H-2K<sup>b</sup> #20）を組み合わせることにより、目的とするH-2K<sup>b</sup> ゲノムDNAが構築できることが明らかとなった。そこで、これらクローンを制限酵素消化で切断したのち、PCR変異の無いそれぞれの領域を互いに組み合わせることにより、PCR変異の無いH-2K<sup>b</sup> ゲノムDNAを構築した。構築方法の模式図を図１に示す。

両クローンを制限酵素Bgl II部位およびEco RI部位で切断し、ライゲーションにより連結して組み換えプラスミドを得た。この組み換えプラスミドを42℃のヒートショック法により大腸菌JM109（東洋紡社製）に導入し、X-GalおよびIPTGを塗布したアンピシリン含有LB寒天培地で組み換えプラスミドが導入されている白色の大腸菌コロニーを判別し、形質転換体を選択した。３個の形質転換体を3mlのアンピシリン含有LB培地にて一晚培養したのち、各形質転換体が包含するプラスミドクローンをアルカリ溶解法により精製し、シーケンスを解析した。方法は上記と同様にして行った。その結果、すべての形質転換体がPCR変異の無いH-2K<sup>b</sup> ゲノムDNAをコードするプラスミドを含有することが明らかとなった。

なお、ここで得られたH-2K<sup>b</sup> ゲノムDNAの塩基配列は、後述する配列番号：３３に記載の塩基配列の第1551位以降の配列に相当するものである。

### 参考例 3

#### キメラゲノムDNA（HLA-A2402/K<sup>b</sup> DNA）の構築

上記実施例１で得られたHLA-A2402ゲノムDNAを含有するプラスミド（HLA-A2402#1）を制限酵素Bgl II部位で切断し、また上記実施例２で得られたH-2K<sup>b</sup> のゲノムDNAを含有するプラスミド（H-2K<sup>b</sup> #20/26）を制限酵素Bam HI部位で切断し、ライゲーションにより連結して組み換えプラスミドを得た。構築方法の模式図を図２に示す。この組み換えプラスミドを42℃のヒートショック法により大腸菌JM109（東洋紡社製）に導入し、X-GalおよびIPTGを塗布したアンピシリン含有LB寒天培地で組み換えプラスミドが導入されている白色の大腸菌コロニーを判別し、



形質転換体を選択した。10個の形質転換体を3mlのアンピシリン含有LB培地にて一晩培養したのち、各形質転換体が包含するプラスミドクローンを精製してシーケンスを解析した。方法は上記と同様にして行った。その結果、3個の形質転換体が目的のキメラ遺伝子（HLA-A2402/K<sup>b</sup> DNA、単にA2402/K<sup>b</sup> DNAと略することもある）を有するプラスミドを含有することが明らかとなった。構築されたHLA-A2402/K<sup>b</sup> のゲノム配列を配列番号：33に記載する。

#### 参考例 4

##### キメラゲノムDNAのスプライシング解析

マウス腫瘍細胞株EL4細胞へ、遺伝子導入装置（島津製作所製）を用い、添付プロトコールに従い、構築したキメラHLA遺伝子（HLA-A2402/K<sup>b</sup> 遺伝子）をトランスフェクトした。2日後、トランスフェクトしたEL4細胞およびコントロールとして遺伝子導入していないEL4細胞より、ISOGEN（ニッポンジーン社製）を用いて添付のプロトコールに従って、トータルRNAを精製した。次に、スーパースク립ト CHOIS システム（GIBCO BRL社製）を用いて、添付プロトコールに従い、当該RNAの一部を鋳型にOligo(dT)<sub>12-18</sub>により逆転写反応を行いcDNAを合成した。更に、当該cDNAの一部を鋳型にNative Pfu DNA Polymerase（Stratagene社製）を用い、添付のプロトコールに従い、キメラ遺伝子の特異的にPCR増幅した。

このとき、上流プライマーとしてHLA-A2402遺伝子のエキソン1にコードされ且つH-2K<sup>b</sup> 遺伝子と相同性の低いChimera-F2（5'-CGA ACC CTC GTC CTG CTA CTC TC-3', 23mer、配列番号：42）を、一方の下流プライマーとしてH-2K<sup>b</sup> 遺伝子のエキソン8にコードされ且つHLA-A2402遺伝子と相同性が低いChimera-R2（5'-AGC ATA GTC CCC TCC TTT TCC AC-3', 23mer、配列番号：43）を用い、PCRは95℃45秒を熱処理した後、95℃45秒、53℃1分、および72℃2分を40サイクル繰り返したのち、72℃で10分反応させ、その後4℃に冷却した。

その結果、トランスフェクトしたEL4細胞においてのみ特異的に約1.1kbp遺伝子断片が増幅したことより、導入したキメラゲノムDNAはマウス細胞内で転写されたこと、すなわちHLAプロモーターが機能し、予想した部位でスプライシング

されたmRNAが発現していることが予想された。次に、前記PCRの増幅断片をシー  
クエンス解析した結果、予想通りのHLA-A2402/K<sup>b</sup>をコードするcDNAの塩基配列が  
決定された。当該HLA-A2402/K<sup>b</sup>のcDNAの塩基配列を配列番号：34に、またその  
アミノ酸配列を配列番号：35に記載する。さらに、配列番号：33に記載の  
5 HLA-A2402/K<sup>b</sup>のゲノム配列と配列番号：34に記載のcDNA配列との位置関係を示  
したものを、図3～図5に示す。

#### 参考例5

##### マイクロインジェクション用DNA溶液の製造

10 構築したキメラHLA遺伝子をコードするプラスミド11 $\mu$ gを制限酵素Hind IIIと  
Eco RI、更にベクターのみを切断する制限酵素Dra Iで消化した。1% SeaKem GTG  
(ニッポンジーン社製)ゲルで電気泳動したのち、キメラゲノムDNAを含有する  
ゲル片を回収した。その後、Prep-A-Gene purificationキット(バイオ・ラッド  
社製)を用い、添付プロトコルに従い、導入遺伝子を精製し、1/10 TEバッ  
15 ファー(10mM Tris pH 8、0.1mM EDTA pH 8)に溶解することにより、マイクロ  
インジェクション用DNA溶液を製造した。

#### 参考例6

##### マウス受精卵への導入とトランスジェニックマウスの同定

20 C57BL/6系統マウス由来の受精卵を対象に構築したキメラ遺伝子のインジェク  
ションを施行した。

C57BL/6系統マウス由来の受精卵を用いた理由は、C57BL/6系統マウスはクラス  
I分子としてH-2b系統を発現しており、HLA-A2402と同様な結合モチーフを有する  
H-2K<sup>d</sup>を発現していないことによるものである。すなわち、当該C57BL/6系統のト  
25 ランスジェニックマウスにHLA-A24拘束性の抗原ペプチドを投与しても、内因性  
のマウスクラスIによって当該ペプチドが細胞表面に提示されず、交差反応が起  
こらないという利点を有する。

第1回目のインジェクションでは、81個の受精卵を対象に施行し、4匹のレン  
ピエントマウスに移植したが産出されなかった。第2回目のインジェクションで

は、50個の受精卵を対象に施行し、2匹のレシピエントマウスに移植することにより4匹が産出されたが離乳前にすべて死亡した。第3回目のインジェクションでは101個の受精卵を対象に施行し、4匹のレシピエントマウスに移植することにより11匹が産出されたが離乳前にすべて死亡した。

- 5 第4回目のインジェクションでは、168個の受精卵を対象に施行し、6匹のレシピエントマウスに移植することにより22匹が産出され、19匹が離乳した。その中の4匹、すなわち01-4、04-2、05-1、および05-6がトランスジェニックマウスとして同定されたが、01-4は奇形のため交配不可能で、05-6は離乳後まもなく死亡した。第5回目のインジェクションでは、221個の受精卵を対象に施行し、8匹の
- 10 レシピエントマウスに移植することにより14匹が産出され、6匹が離乳した。その中の3匹、すなわち04-1、04-5、および04-6がトランスジェニックマウスとして同定された。第6回目のインジェクションでは、225個の受精卵を対象に施行し、8匹のレシピエントマウスに移植することにより13匹が産出され、9匹が離乳した。その中の3匹、すなわち10-5、14-1、および15-2がトランスジェニックマウスとして同定された。
- 15

- ここでトランスジェニックマウスの同定は、HLA-A2402遺伝子のクローニングで使用したプライマー、すなわちHLA26-1F（配列番号：36）およびA24-Bgl II 30（配列番号：37）を用いて尾DNA調整物を鋳型にTaKaRa LA Taq™（宝酒造社株式会社製）を用い、添付のプロトコールに従ってPCRを行い、1%アガロース
- 20 ゲル電気泳動を行い、1.5kbpの大きさのDNAバンドがみられるマウスを選別することにより行った。

#### 参考例 7

##### トランスジェニックマウスにおける導入遺伝子産物の発現

- 25 実施例6で作出された8ライン、すなわち04-2、05-1、04-1、04-5、04-6、10-5、14-1、および15-2由来のトランスジェニックマウスより、J. E. Coliganら編、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. の記載に従い脾臓を摘出し、脾細胞を回収した。トランスジェニックマウス脾細胞における導入遺伝子由来のタンパク質であるHLA-A2402/K<sup>b</sup>の細胞表面発現は、フローサイトメト

リー法により解析した。このとき、C57BL/6系統マウスより調整した脾細胞をコントロールとして用いた。具体的には、 $5 \times 10^6$  個の脾細胞をモノクローナルな FITC 標識抗HLA抗体B9.12.1 (Immunotech社製) で染色した。また、モノクローナルなFITC標識抗H-2K<sup>b</sup> 抗体AF6-88.5 (Pharminogen社製) で内因性のマウスクラスI を染色した。

その結果、5ライン、すなわち04-1、04-5、10-5、14-1、および15-2でHLAクラスI特異的な発現がみられ、このうち04-1ラインのみが、繁殖能を有するラインであることが明らかとなった。一方、他の3ライン、すなわち04-6、04-2、および05-1ラインではHLAクラスI特異的な発現はみられなかった。以上により、8ラインのトランスジェニックマウスが作出されたが、クラスIの発現様式であり且つホモ化を達成したのは04-1ラインのみであった。

#### 参考例 8

##### HLA-A2402を発現する形質転換細胞の樹立

前記で作製されたトランスジェニックマウスにおけるCTL誘導活性の評価のために、HLA-A2402/K<sup>b</sup> を安定に発現する形質転換細胞、Jurkat-A2402/K<sup>b</sup> 細胞を樹立した。

##### (1) 発現ベクターの構築

Tgマウスより脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。ISOGEN (ニッポンジーン社製) を用い、添付のプロトコールに従って、トータルRNAを精製した。次に、スーパースク립トチョイスシステム (GIBCO BRL社製) を用いて、添付プロトコールに従い、当該RNAの一部を鋳型にOligo(dT)<sub>12-18</sub>により逆転写反応を行いcDNAを合成した。更に、当該cDNAの一部を鋳型にLA-PCRキット (宝酒造社製) を用い、添付のプロトコールに従った。このとき、上流プライマーとしてchi.PF1 (5'-CCC AAG CTT CGC CGA GGA TGG CCG TCA TGG CGC CCC GAA-3'、配列番号: 4 4) を、一方の下流プライマーとしてchi.PR1 (5'-CCG GAA TTC TGT CTT CAC GCT AGA GAA TGA GGG TCA TGA AC-3'、配列番号: 4 5) を用いた。PCRは95°C45秒で熱処理した後、95°C45秒、60°C1分、および68°C2分を25サイクル繰り返したのち、72°Cで10分反応させ、その後4°Cに冷却した。PCR増幅遺伝子を発現ベ

クターpcDNA3.1(+) (Invitrogen社製) に導入することにより、HLA-A2402/K<sup>b</sup> をコードする発現ベクターを構築した。

## (2) Jurkat細胞への導入

5 10ugの上記ベクターを制限酵素Pvu Iで消化することにより、直線化した。次に、Jurkat細胞 (ATCC T1B-152) 5×10<sup>6</sup> 個について、遺伝子導入装置 (GIBCO BRL社製) を用い、添付プロトコールに従い、構築したキメラHLA遺伝子をトランスフェクトした。96穴プレートに0.5cell/wellで播種し、0.6mg/mlのGeneticin含有培地で培養した。その結果、6穴中 (6 クローン) にて細胞の増殖が確認された (A-2、A-4、A-6、A-9、A-10、A-11) 。これらの中で、A-10において導入遺伝子の発現が最も高かったことより、当クローンをJurkat-A2402/K<sup>b</sup> 細胞として樹立した。

## 参考例 9

### トランスジェニックマウスにおけるCTL誘導活性試験

15 ヒト癌抗原HER-2/neuは乳癌、卵巣癌、および肺癌で過剰発現していることで知られ、当該抗原由来ペプチドによってHLA-A24陽性健常人末梢血から特異的CTLを誘導できることが、イン・ビトロ試験により明らかにされている (Int. J. Cancer., 87:553, 2000) 。

そこで、当該ヒト癌抗原由来のHLA-A24拘束性ペプチドHER-2/neu<sub>780-788</sub> (配列番号: 46) を、破傷風毒素由来のマウスMHCクラスIIのI-A<sup>b</sup> 拘束性ヘルパーペプチド (Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu;配列番号: 32) と共に当該トランスジェニックマウスに免疫し、ヒトの場合と同様に特異的CTLを誘導し得るか調べた。すなわち、DMSOによりHER-2/neu<sub>780-788</sub> を40mg/mlに、またヘルパーペプチドを20mg/mlに調整し、生理食塩水で2mg/mlおよび1mg/mlに希釈した。次に、ガラスシリンジを用いて、等量の不完全フロイントアジュバント (和光純薬株式会社製) と混合することによりwater-in-oilエマルションを作製した。200 μlの当該薬剤をトランスジェニックマウス (04-1ライン) の尾の皮下に免疫した。実験開始7日後に脾臓を摘出し、スライドガラスのフロスト部分にて擦り破壊し、脾細胞を回収・調製

した。ACKバッファー (0.15M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM  $\text{KHCO}_3$ , 0.1mM EDTA, pH7.2-7.4) にて溶血処理した脾細胞の一部をX線照射 (2,000 rad) した後、前記ペプチドを100  $\mu\text{g/ml}$  で1時間パルスして0.7 $\times 10^6$  個/wellで24穴プレートに播種した。このとき、非照射・非ペプチドパルスの7 $\times 10^6$  個/wellの脾細胞を同時に加えて37 $^{\circ}\text{C}$ 下で再刺激を施行した (ペプチド終濃度1  $\mu\text{g/ml}$ )。培養液には、RPMI1640 培地に10%FCS、10mM HEPES、20mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、1mM MEM非必須アミノ酸、1%MEMビタミン、55  $\mu\text{M}$  2-メルカプトエタノールを含む培養液 (CTM培養液) を10ml用い、6日間イン・ビトロ刺激した。

他方、実施例8で作製したJurkat-A2402/ $\text{K}^b$ 細胞を3.7MBq/ $10^6$  個で $^{51}\text{Cr}$ ラベル後、前記ペプチドを100  $\mu\text{g/ml}$  で1時間パルスした。(ラベル時間2時間、ラベル開始1時間後にペプチドを終濃度100  $\mu\text{g/ml}$  添加)。また、ペプチド非パルスの細胞をコントロール標的細胞として調製した。

当該Jurkat-A2402/ $\text{K}^b$ を標的細胞とし、先に調製されたトランスジェニックマウス脾細胞調製物を添加して、CTLの誘導活性を $^{51}\text{Cr}$ リリースアッセイ (J. Immunol., 159: 4753, 1997) により測定した。結果を図6に示す。結果として、HER-2/neu<sub>780-788</sub>で刺激することにより、特異的なCTLの誘導が認められた。

さらに、前記HER-2/neu<sub>780-788</sub>と同様にHLA-A24拘束性癌抗原ペプチドであることが知られているMAGE-3<sub>195-203</sub> (配列番号: 47)、CEA<sub>652-660</sub> (配列番号: 48)、およびCEA<sub>268-277</sub> (配列番号: 49) を用いて、前記と同様のCTL誘導活性試験を行った。結果を図7～図9に示す。結果として、これら既知のHLA-A24拘束性癌抗原ペプチドで刺激することにより、特異的なCTLの誘導が認められた。

以上の結果から、本発明のHLA-A24トランスジェニックマウスは、HLA-A24拘束性の癌抗原タンパクや癌抗原ペプチドをin vivoで評価することのできるヒトモデル動物であることが明らかとなった。

## 実施例 1

### ヒトWT1由来の天然型および改変型ペプチドによるCTL誘導活性

HLA抗原に結合可能な配列を検索するためのBIMASソフト ([http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/)) を用いて、ヒトWT1 アミノ酸配列中の HLA-A24抗原

への推定結合配列を検索した。検索により同定されたペプチドの例を以下に示す。

ペプチドA : Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号 : 8)

ペプチドB : Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号 : 7)

ペプチドC : Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号 : 9)

5 ペプチドD : Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe (配列番号 : 10)

ペプチドE : Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe (配列番号 : 11)

ここでペプチドAはヒトWT1のアミノ酸配列の第126-134位に、ペプチドBは第302-310位に、ペプチドCは417-425位に、ペプチドDは第285-294位に、またペプチドEは第326位-335位に、それぞれ該当する配列である。これらのペプチドを  
10 Fmoc法により合成した。

また、前記天然型ペプチドA~Cの第2位のアミノ酸をチロシンに改変した改変型ペプチドについてもFmoc法により合成した。

ペプチドF : Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号 : 2)

ペプチドG : Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号 : 3)

15 ペプチドH : Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号 : 4)

各抗原ペプチドの免疫原性について、先の参考例にて作製したHLA-A2402/K<sup>b</sup> トランスジェニックマウスを利用することにより評価した。1ペプチドにつき3匹のトランスジェニックマウスに免疫することにより、それぞれのペプチドの免疫原性を評価した。

20 マウスMHCクラスIIのI-A<sup>b</sup> 拘束性ヘルパーペプチドである破傷風毒素由来ペプチド (Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu;配列番号 : 32) と共に各合成ペプチドをトランスジェニックマウスに免疫した。すなわち、DMSOに各抗原ペプチドをそれぞれ40mg/ml、ヘルパーペプチドを20mg/mlに調整し、さらに生理食塩水で2mg/mlおよび1mg/ml  
25 にそれぞれ希釈した。次に、ガラスシリンジを用いて、等量のフロイントの不完全アジュバント (IFA) と混合することによりwater-in-oilエマルジョンを作製し、200  $\mu$  lの当該エマルジョンをHLA-A2402/K<sup>b</sup> トランスジェニックマウスの尾底部の皮下に免疫した。実験開始7日後に脾臓を摘出し、スライドガラスのフロスト部分にて擦り破壊し、脾細胞を回収・調製した。ACKバッファ (0.15M NH<sub>4</sub>Cl、

10mM  $\text{KHCO}_3$ 、0.1mM EDTA, pH7.2-7.4) にて溶血処理した脾細胞の一部をX線照射 (2,000rad) した後、前記抗原ペプチドを100  $\mu\text{g/ml}$  で1時間パルスして  $7 \times 10^6$  個/wellで24穴プレートに播種した。このとき、非照射・非ペプチドパルスの  $7 \times 10^5$  個/wellの脾細胞を同時に加えて37°C下で6日間イン・ビトロ刺激培養した。この際の培地として、RPMI-1640培地に10%FCS、10mM HEPES、20mM L-グルタミン、1mM ピルビン酸ナトリウム、1mM MEM非必須アミノ酸、1% MEMビタミン、55  $\mu\text{M}$  2-メルカプトエタノールを用いた。

次に、常法に従って細胞傷害性試験を行った。標的細胞 (T) として、Jurkat-A2402/ $\text{K}^b$  細胞 (参考例8)、およびペプチドパルスしたJurkat-A2402/ $\text{K}^b$  細胞を用いた。これらの細胞は3.7MBq/ $10^6$  個で $^{51}\text{Cr}$ ラベルし、ペプチドパルスは100  $\mu\text{g/ml}$  で1時間実施された (ラベル時間2時間、ラベル開始1時間後にペプチドを添加)。イン・ビトロ刺激培養した脾細胞をエフェクター細胞 (E) とし、E/T比80において作用させ、傷害活性を $^{51}\text{Cr}$ リリースアッセイ (J. Immunol., 159: 4753, 1997) により測定した。結果を図10～図17に示す。Y軸は傷害活性を示し、X軸の1、2、および3は、3匹のマウスの個体番号を示す。

これらの図から明らかな通り、試験したWT1天然型ペプチド5種類の中では、ペプチドBのみが免疫原性を有していた。また、天然型ペプチドBの第2位のアミノ酸をチロシンに改変した改変型ペプチドGは、ペプチドBより高い免疫原性を示した。さらに、天然型ペプチドAおよびCの第2位のアミノ酸をチロシンに改変した改変型ペプチドFおよびHは、もとのペプチドAおよびCが免疫原性を有していなかったにもかかわらず、高い免疫原性を有していた。

以上の結果から、WT1天然型ペプチドB、改変型ペプチドF、G、およびHは、イン・ビボでCTL誘導活性を有する抗原ペプチドとして機能を有することが明らかとなった。

## 実施例 2

### ヒトWT1由来の改変型ペプチドによるCTL誘導活性 (II)

実施例1と同様、BIMASソフトにより検索された、HLA-A24抗原への推定結合配列を有するヒトWT1由来の以下の天然型ペプチド (ペプチドK、L)、およびその



第2位のアミノ酸をチロシンに改変した改変型ペプチド（ペプチドI、J）を、Fmoc法により合成した。

ペプチドK：Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu（配列番号：51）

ペプチドL：Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu（配列番号：52）

5 ペプチドI：Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu（配列番号：5）

ペプチドJ：Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu（配列番号：6）

10 ここでペプチドKはヒトWT1のアミノ酸配列の第10-18位に、またペプチドLは第239位-247位にそれぞれ該当するペプチドであり、さらにペプチドIおよびJはそれぞれペプチドKおよびLの配列中第2位のアミノ酸残基をチロシンに改変した改変型ペプチドである。これらの天然型および改変型ペプチドについて、実施例1と同様にして免疫原性を評価した。結果を図18、19、21および22に示す。Y軸は傷害活性を示し、X軸の1、2、および3は、3匹のマウスの個体番号を示す。

15 これらの図から明らかな通り、天然型ペプチドKおよびLが免疫原性を有していないにもかかわらず、改変型ペプチドIおよびJは、いずれも高い免疫原性を有することが示された。

以上の結果から、WT1改変型ペプチドIおよびJは、イン・ビボで細胞傷害性T細胞を誘導する抗原ペプチドとして機能を有することが明らかとなった。

### 実施例3

#### 20 ヒトWT1由来の改変型ペプチドによる細胞傷害活性

改変型ペプチドによって誘導されたエフェクター細胞の天然型ペプチドに対する交差反応性を試験した。前記改変型ペプチドHをマウスに免疫することにより誘導されたエフェクター細胞（E）と、標的細胞（T）として天然型ペプチドCをパルスしたJurkat-A2402/K<sup>b</sup>細胞とを、E/T比80において作用させ、傷害活性を  
25 <sup>51</sup>Crリリースアッセイにより測定した。結果を図20に示す。この図から明らかな通り、WT1改変型ペプチドで誘導したエフェクター細胞は変異型および天然型をパルスしたいずれの細胞に対しても細胞傷害活性を示した。

### 実施例4

ヒトWT1由来の改変型ペプチドによるヒト末梢血単核球からのCTL誘導

HLA-A2402陽性の健常人から末梢血単核球を分離し、24ウェルプレートに4×10<sup>6</sup>細胞／ウェルの量で分配し、これに配列番号7の天然型ペプチドまたは配列番号3の改変型ペプチドを10 μMの濃度になるように添加し、1週間培養した。この際  
5 際の培地として、45%RPMI1640、45%AIV、10%非働化ヒトAB血清、1×非必須アミノ酸、25ng/ml 2-メルカプトエタノール、50mg/ml ストレプトマイシン、50U/ml ペニシリンを用いた。上記の培養の後、細胞を2×10<sup>6</sup>細胞／ウェルに調製し、レスポンドー（responder）細胞とした。他方、上記と同じ健常人から分離した末梢血単核球に、前記いずれかのペプチド10 μMと共に4時間培養してペ  
10 プチドパルスし、次に30Gyの放射線照射した後、細胞を4×10<sup>6</sup>細胞／ウェルに調製し、スティミュレーター（stimulator）細胞とした。

上記のようにして調製したレスポンドー細胞とスティミュレーター細胞を混合し、更にIL-2を30U/mlの濃度で加えて培養した。同様なレスポンドー細胞に対するスティミュレーター細胞による刺激を1週間ごとに3回実施した。このように  
15 して得られた細胞の細胞傷害性を<sup>51</sup>Crリリースアッセイにより測定した。標的細胞（T）として<sup>51</sup>Crで標識したHLA-A24陽性のC1R-A\*2402細胞（Int. J. Cancer, 81, p387, 1999）に配列番号7の天然型ペプチドをパルスした細胞を用い、上記の通りに配列番号7の天然型ペプチドまたは配列番号3の改変型ペプチドにより刺激した細胞（エフェクター細胞）（E）をE:T比10、20または40において作用させ、  
20 細胞傷害活性を測定した。結果を図23に示す。この図から明らかな通り、改変型ペプチドは天然型ペプチドを認識するCTLを誘導することができ、そして天然型よりも優れたCTL誘導活性を示した。また、標的細胞をWT1陽性でHLA-A24陽性の肺癌細胞株RERF-LC-AI細胞、WT陽性でHLA-A2402陰性の肺癌細胞株11-18細胞、またはWT1陰性でHLA-A24陽性の肺癌細胞株11-18細胞を用いて、同様に上記のエフェ  
25 クター細胞の細胞傷害活性を<sup>51</sup>Crリリースアッセイにより測定した。結果を図24に示す。改変型ペプチドおよび天然型ペプチドにより刺激されたエフェクター細胞は、WT1とHLA-A2402が共に陽性のRERF-LC-AI細胞のみを特異的に傷害することから、ペプチド刺激によりHLA-A2402拘束性のWT1特異的CTLが誘導されていることが示された。また、改変型ペプチドの方が天然型ペプチドよりも優れたCTL

誘導活性を示した。

## 実施例 5

### システイン残基置換型ペプチドによるCTL誘導活性

5      ペプチドH (Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe ; 配列番号 : 4) は第5位にシステイン残基を有する。当該システイン残基は溶液中で酸化されジスルフィド結合を生じる可能性がある。そこで、第5位のシステイン残基をセリン残基、アラニン残基、または $\alpha$ -アミノ酪酸に置換した置換型ペプチド (ペプチドM、N、O) を合成し、それぞれのイン・ビボでの免疫原性を検討した。

10      ペプチドM : Arg-Tyr-Pro-Ser-Ser-Gln-Lys-Lys-Phe (配列番号 : 6 6)

ペプチドN : Arg-Tyr-Pro-Ser-Ala-Gln-Lys-Lys-Phe (配列番号 : 6 7)

ペプチドO : Arg-Tyr-Pro-Ser-Abu-Gln-Lys-Lys-Phe (配列番号 : 6 8)

15      これら置換型ペプチドM、NおよびOをFmoc法により合成し、実施例 1 と同様にして免疫原性を評価した。なお細胞傷害性試験は、イン・ビトロで刺激培養した脾細胞をエフェクター細胞 (E) として標的細胞と各種の比率で混合することにより $^{51}\text{Cr}$ リリースアッセイ (J. Immunol 1997; 159:4753) を実施し、エフェクター細胞の傷害活性を測定することにより行った。結果を図25~28に示す。縦軸は傷害活性を示し、横軸の値はE/T比を示す。

20      これらの図から明らかな通り、ペプチドH の第5位のシステイン残基を、セリン残基、アラニン残基、あるいは $\alpha$ -アミノ酪酸に置換したペプチドM、NおよびOは、置換前のペプチド (ペプチドH) と同等の免疫原性を有していることが示された。

## 実施例 6

### システイン残基置換型ペプチドによる細胞傷害活性

25      置換型ペプチドによって誘導されたエフェクター細胞の非置換型ペプチドに対する交差反応性を試験した。ペプチドMまたはNをマウスに免疫することにより誘導されたエフェクター細胞 (E) に対して、ペプチドMまたはNをパルス、ペプチドHをパルス、あるいはペプチド非パルスのJurkat-A2402/ $\text{K}^b$  細胞を標的細胞

(T) として作用させ、エフェクター細胞の細胞傷害活性を $^{51}\text{Cr}$ リリースアッセイにより測定した。結果を図29および30に示す。

この図から明らかな通り、置換型ペプチドで誘導したエフェクター細胞は、置換型ペプチド（ペプチドM、ペプチドN；図中免疫ペプチド）および非置換型ペプチド（ペプチドH）をパルスしたいずれの細胞に対しても細胞傷害活性を示した。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、イン・ビボにおいてCTL誘導活性を有するWT1由来のHLA-A24拘束性ペプチド、当該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはこれらペプチドやポリヌクレオチドを含む癌ワクチンなどが提供される。本発明の癌ワクチンは多くの癌患者を処置することができる。

## 請 求 の 範 囲

1. 以下のアミノ酸配列：

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：2)、

5 Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：3)、

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：4)、

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：5)、および

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号：6)、

のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド。

10 2. 配列番号：2、3、4、5および6のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなる、請求項1記載のペプチド。

3. 配列番号：2、3、4、5および6のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み、かつHLA-A24拘束性のCTL誘導活性を有するペプチド（ただし、配列番号7のアミノ酸配列を有するペプチドは除く）。

15

4. 配列番号：2、3、5および6のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列の第9位のロイシンをフェニルアラニン、トリプトファン、イソロイシンまたはメチオニンに置換した改変アミノ酸配列を含む、請求項3記載のペプチド。

5. 配列番号：4のアミノ酸配列の第9位のフェニルアラニンをトリプトファン、ロイシン、イソロイシンまたはメチオニンに置換した改変アミノ酸配列を含む、請求項3記載のペプチド。

20

6. 配列番号：4のアミノ酸配列の第5位のシステインをアラニン、セリンまたは $\alpha$ -アミノ酪酸に置換した改変アミノ酸配列（配列番号：66、67または68）を含む、請求項3記載のペプチド。

25

7. 配列番号：2、3、4、5および6のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列からなる、請求項3～6のいずれか記載のペプチド。

8. 請求項1～7のいずれか記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド。

9. 配列番号：2～6および66～68のなかから選ばれるいずれかのアミ

ノ酸配列をコードする、請求項 8 記載のポリヌクレオチド。

10. 請求項 8 または 9 記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

11. 請求項 10 記載の発現ベクターを含有する細胞。

5 12. 請求項 11 記載の細胞を、ペプチドの発現可能な条件下で培養すること  
を特徴とする、請求項 1～7 のいずれか記載のペプチドの製造方法。

13. 請求項 1～7 のいずれか記載のペプチドに特異的に結合する抗体。

14. 請求項 1～7 のいずれか記載のペプチド由来の癌抗原ペプチドと HLA-A24 抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞。

10 15. 配列番号：2～6 および 66～68 のなかから選ばれるいずれかのア  
ミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドと HLA-A24 抗原との複合体が提示され  
ている、請求項 14 記載の抗原提示細胞。

16. 請求項 1～7 のいずれか記載のペプチド由来の癌抗原ペプチドと HLA-A24 抗原との複合体を認識する CTL。

15 17. 配列番号：2～6 および 66～68 のなかから選ばれるいずれかのア  
ミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドと HLA-A24 抗原との複合体を認識する、  
請求項 16 記載の CTL。

20 18. 請求項 1～7 のいずれか記載のペプチド、請求項 8 または 9 記載のポ  
リヌクレオチド、請求項 10 記載の発現ベクター、請求項 11 記載の細胞、請求  
項 14 または 15 記載の抗原提示細胞、あるいは請求項 16 または 17 記載の C  
TL と、薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物。

19. 請求項 1～7 のいずれか記載のペプチド、請求項 8 または 9 記載のポ  
リヌクレオチド、請求項 10 記載の発現ベクター、請求項 11 記載の細胞、請求  
項 14 または 15 記載の抗原提示細胞、あるいは請求項 16 または 17 記載の C  
TL を有効成分とする癌ワクチン。

25 20. 請求項 1～7 のいずれか記載のペプチド、請求項 8 または 9 記載のポ  
リヌクレオチド、請求項 10 記載の発現ベクター、請求項 11 記載の細胞、請求  
項 14 または 15 記載の抗原提示細胞、あるいは請求項 16 または 17 記載の C  
TL における、癌ワクチンを製造するための使用。

21. 癌を治療または予防するための方法であって、請求項 1～7 のいずれ

か記載のペプチド、請求項 8 または 9 記載のポリヌクレオチド、請求項 10 記載の発現ベクター、請求項 11 記載の細胞、請求項 14 または 15 記載の抗原提示細胞、あるいは請求項 16 または 17 記載のCTLの治療または予防に有効な量を、それを必要としているHLA-A24陽性かつWT1陽性の癌患者に投与する方法。

22. 以下のa)～f)

a) Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：7) を含むペプチド、

b) 上記a)のペプチドをコードするポリヌクレオチド、

c) 上記b)のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、

d) 上記c)の発現ベクターを含有する細胞、

e) 上記a)のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞、および

f) 上記a)のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を認識するCTL、

のなかから選ばれるいずれかと薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物。

23. 以下のa)～f)：

a) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むペプチド、

b) 上記a)のペプチドをコードするポリヌクレオチド、

c) 上記b)のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、

d) 上記c)の発現ベクターを含有する細胞、

e) 上記a)のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞、および

f) 上記a)のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を認識するCTL、

のなかから選ばれるいずれかを有効成分とする癌ワクチン。

24. 以下のa)～f)：

a) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むペプチド、

b) 上記a)のペプチドをコードするポリヌクレオチド、

c) 上記b)のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、

- d) 上記 c) の発現ベクターを含有する細胞、
- e) 上記 a) のペプチド由来の癌抗原ペプチドと H L A - A 2 4 抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞、および
- f) 上記 a) のペプチド由来の癌抗原ペプチドと H L A - A 2 4 抗原との複合体を認識する C T L、

5

のなかから選ばれるいずれかにおける、癌ワクチンを製造するための使用。

25. 癌を治療または予防するための方法であって、以下の a) ~ f) :

- a) 配列番号: 7 のアミノ酸配列を含むペプチド、
- b) 上記 a) のペプチドをコードするポリヌクレオチド、
- c) 上記 b) のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、
- d) 上記 c) の発現ベクターを含有する細胞、
- e) 上記 a) のペプチド由来の癌抗原ペプチドと H L A - A 2 4 抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞、および
- f) 上記 a) のペプチド由来の癌抗原ペプチドと H L A - A 2 4 抗原との複合体を認識する C T L、

10

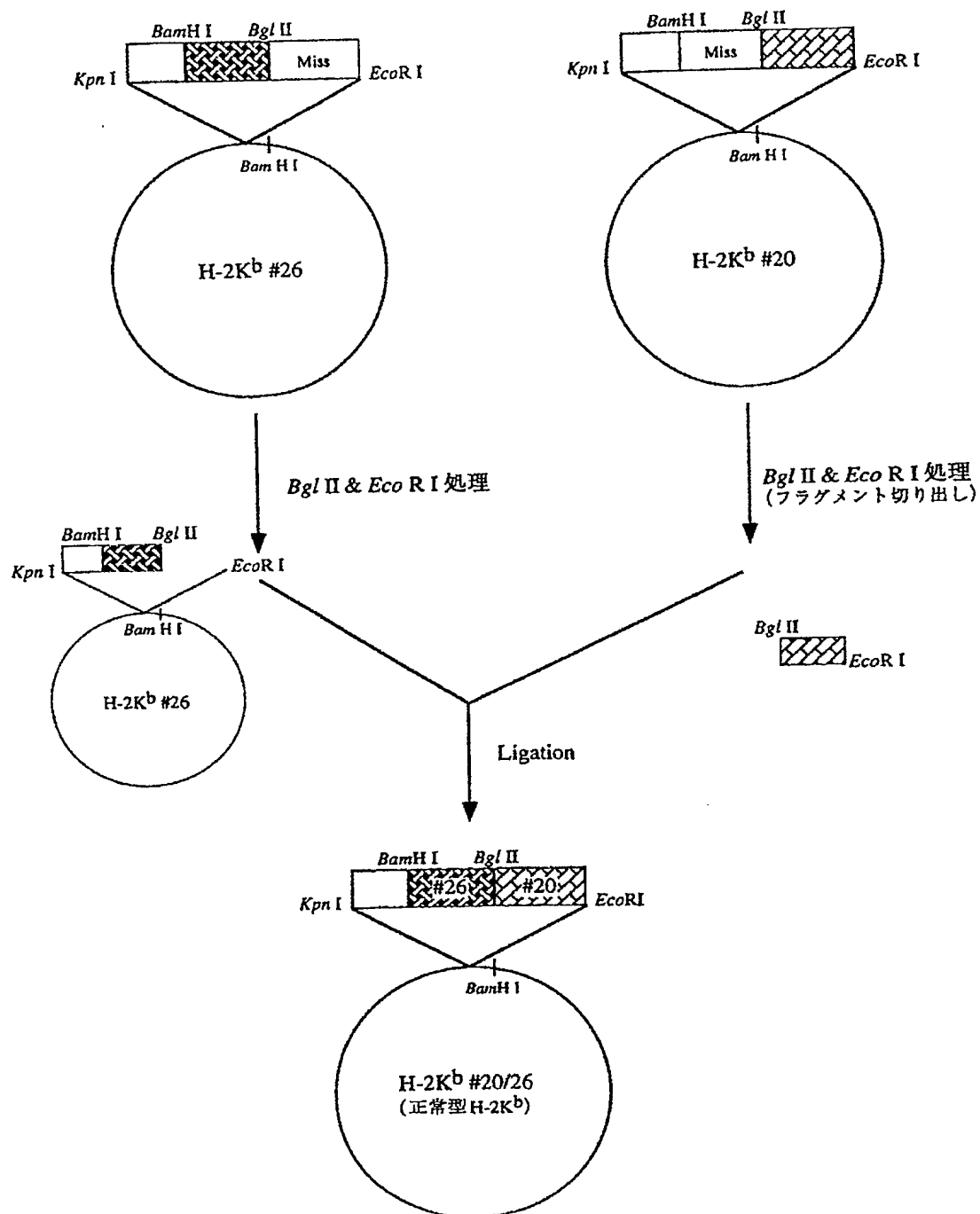
15

のなかから選ばれるいずれかの治療または予防に有効な量を、それを必要としている H L A - A 2 4 陽性かつ W T 1 陽性の癌患者に投与方法。



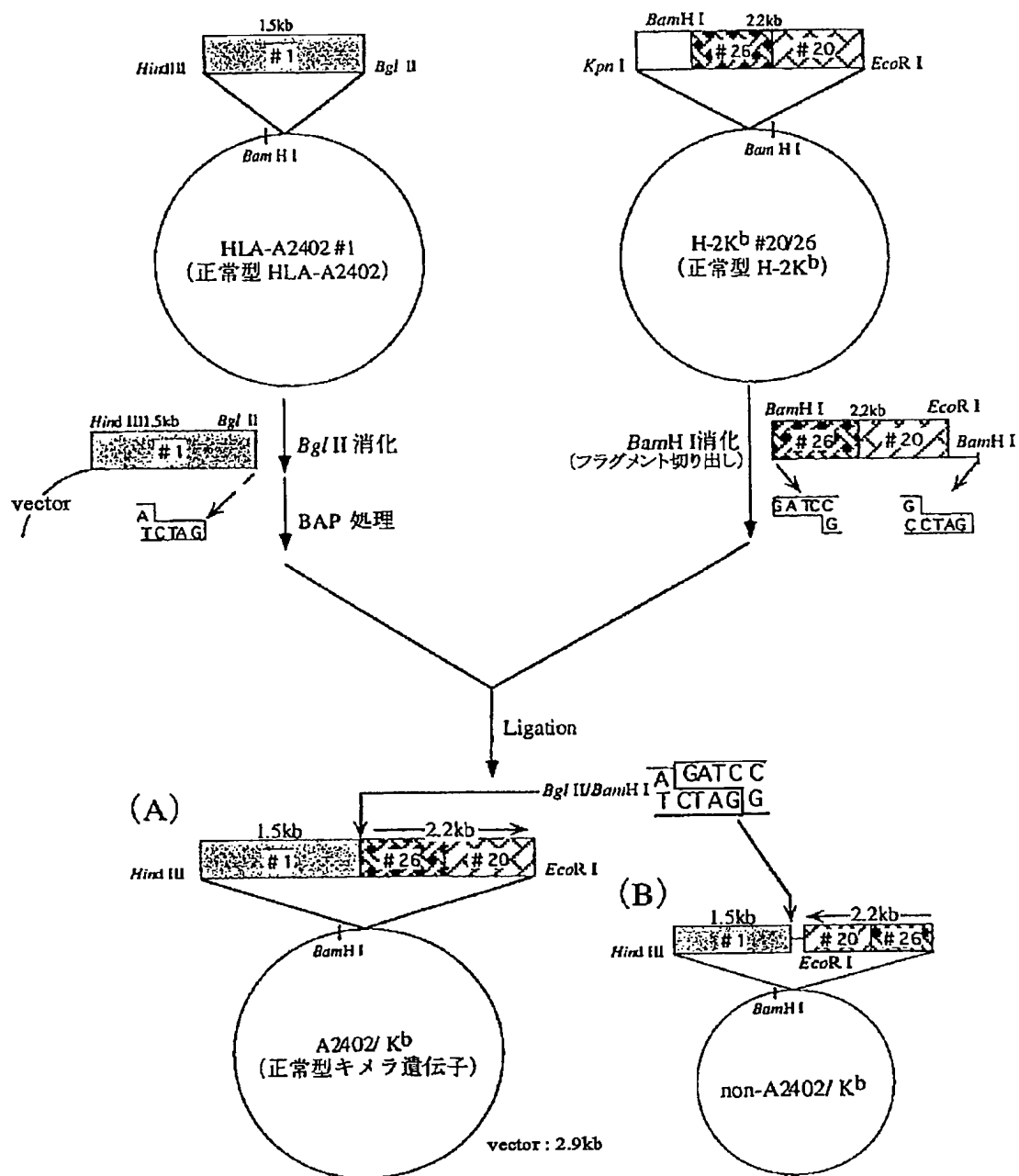
1/21

図 1



2/21

図 2





HLA-A*2402/Kb genome	1400	GTACGATCAG, TAGGCTTACG, ACGGGAAGGA, TTGAGATTCGG, CTGAAAGAGG, ACCCTGGCTG, TTGGACACGG, GGGGGAATGG, CGGTGAGAT, CACCAAGCG, GTACCAACAG, TAGGCTTACG, ACGGGAAGGA, TTGAGATTCGG, CTGAAAGAGG, ACCCTGGCTG, TTGGACACGG, GGGGGAATGG, CGGTGAGAT, CACCAAGCG
HLA-A*2402/Kb cDNA	507	
HLA-A*2402/Kb genome	1500	AAGTGTGGAG, CGGGCCATGT, GGCGGAGCAG, CACAGAGGCT, AACTGGAGGG, CAGCTGTGGT, GAGCGGGTCT, GGAGATAGCT, GAGAACGGG, AAGGAGAC, AAGTGTGGAG, CGGGCCATGT, GGCGGAGCAG, CACAGAGGCT, AACTGGAGGG, CAGCTGTGGT, GAGCGGGTCT, GGAGATAGCT, GAGAACGGG, AAGGAGAC
HLA-A*2402/Kb cDNA	607	
HLA-A*2402/Kb genome	1600	TGAGGGCAG, GGTATACCAG, GCCCAGCGGG, CGCTTACCTG, ATCGCCTGTA, GATCTGTGT, GACACACCTG, TACCTTGTTC, CCGAGATCA, GGGGCTGGGA, TGAGGGCAG, GGTATACCAG, GCCCAGCGGG, CGCTTACCTG, ATCGCCTGTA, GATCTGTGT, GACACACCTG, TACCTTGTTC, CCGAGATCA, GGGGCTGGGA
HLA-A*2402/Kb cDNA	619	
HLA-A*2402/Kb genome	1700	GTCAATTTCT, CTGGCTACAC, ACTATAGTAT, GGCTGTTCAC, TTGGACTGAC, AGTTAAATGT, GGTGAGCAAG, GTGACTACAA, TGGTGTAGTC, TCATGTGTGT, GTCAATTTCT, CTGGCTACAC, ACTATAGTAT, GGCTGTTCAC, TTGGACTGAC, AGTTAAATGT, GGTGAGCAAG, GTGACTACAA, TGGTGTAGTC, TCATGTGTGT
HLA-A*2402/Kb cDNA	619	
HLA-A*2402/Kb genome	1800	CACCTTCAG, GATCATACAG, CCTAAATTT, AATATGACT, CAAACACATA, TTAAATTAGT, TATTTTCACT, TCCTCTCTCC, AATCTTGTAC, TACCTCTCTC, CACCTTCAG, GATCATACAG, CCTAAATTT, AATATGACT, CAAACACATA, TTAAATTAGT, TATTTTCACT, TCCTCTCTCC, AATCTTGTAC, TACCTCTCTC
HLA-A*2402/Kb cDNA	619	
HLA-A*2402/Kb genome	1900	ATGCTATATGA, ACATACATA, AGATTCGCCA, TGTTTACCA, ATGGCTCATG, TGGATTCCT, CTATAGCTTCT, GAGTCCAAA, AGAAATGTG, CAGTCTGTG, ATGCTATATGA, ACATACATA, AGATTCGCCA, TGTTTACCA, ATGGCTCATG, TGGATTCCT, CTATAGCTTCT, GAGTCCAAA, AGAAATGTG, CAGTCTGTG
HLA-A*2402/Kb cDNA	619	
HLA-A*2402/Kb genome	2000	CTGAGGGGAC, CAGCTCTGCT, TTGTGTCACT, AGTGGATGA, CAGTTGACT, GTCAACAGA, CACATAGTTC, ACTGTATCA, TTGATTAAC, TGAGTCTGG, CTGAGGGGAC, CAGCTCTGCT, TTGTGTCACT, AGTGGATGA, CAGTTGACT, GTCAACAGA, CACATAGTTC, ACTGTATCA, TTGATTAAC, TGAGTCTGG
HLA-A*2402/Kb cDNA	619	
HLA-A*2402/Kb genome	2100	GTAGATTTCA, GTTTGTCTTG, TTAAATGTGT, GATTCTCTTA, ATCTTCCACA, CAAATATGCC, AAAGGCCAT, GTGACCATC, ACGGAGAC, TGAAGTAA, GTAGATTTCA, GTTTGTCTTG, TTAAATGTGT, GATTCTCTTA, ATCTTCCACA, CAAATATGCC, AAAGGCCAT, GTGACCATC, ACGGAGAC, TGAAGTAA
HLA-A*2402/Kb cDNA	666	
HLA-A*2402/Kb genome	2200	GTACACCTGA, GATCTGTGGC, CCTGGCTTTC, TACCTGTGTG, ACATATACCT, GACCTGGAG, TTGATGGG, AGGAGTGTAT, CCGAGATAG, GAGCTGTGG, GTACACCTGA, GATCTGTGGC, CCTGGCTTTC, TACCTGTGTG, ACATATACCT, GACCTGGAG, TTGATGGG, AGGAGTGTAT, CCGAGATAG, GAGCTGTGG
HLA-A*2402/Kb cDNA	766	
HLA-A*2402/Kb genome	2300	AGACAGGCC, TCGAGGGGAT, GGAACCTTCC, AGAATGTGGC, AATCTGTGGT, GTGCTCTTG, GGAAGAGCA, GTATTACAC, TGCATGTGT, ACCATCAGG, AGACAGGCC, TCGAGGGGAT, GGAACCTTCC, AGAATGTGGC, AATCTGTGGT, GTGCTCTTG, GGAAGAGCA, GTATTACAC, TGCATGTGT, ACCATCAGG
HLA-A*2402/Kb cDNA	866	
HLA-A*2402/Kb genome	2400	GTGCTCTGAG, CCCCTACCC, TGAGTGGG, TAGGAGAGT, GTGGGTGAG, AGCTGGGCT, AGGAAAGCT, GAGCTTTCT, CGAGACCTG, AGCTGTCTAG, GTGCTCTGAG, CCCCTACCC, TGAGTGGG, TAGGAGAGT, GTGGGTGAG, AGCTGGGCT, AGGAAAGCT, GAGCTTTCT, CGAGACCTG, AGCTGTCTAG
HLA-A*2402/Kb cDNA	895	
HLA-A*2402/Kb genome	2500	GGCTGAGAC, TGGGGTCATG, ACCCTCACT, TCATTTCTTG, TACCTGTCTT, TCCCAAGCC, TCCCTCATTC, ACATGGGAC, CGTTGTCTGT, GGCTGAGAC, TGGGGTCATG, ACCCTCACT, TCATTTCTTG, TACCTGTCTT, TCCCAAGCC, TCCCTCATTC, ACATGGGAC, CGTTGTCTGT
HLA-A*2402/Kb cDNA	939	
HLA-A*2402/Kb genome	2600	CTGGTTGTTC, TTGGAGCTGC, AATATGACT, GAGCTGTGG, TGGCTTTTGT, GATGAGATG, AAGAGGAA, ACACGCTAG, GAAAGGCG, AGTCTGAGTT, CTGGTTGTTC, TTGGAGCTGC, AATATGACT, GAGCTGTGG, TGGCTTTTGT, GATGAGATG, AAGAGGAA, ACACGCTAG, GAAAGGCG, AGTCTGAGTT
HLA-A*2402/Kb cDNA	1015	

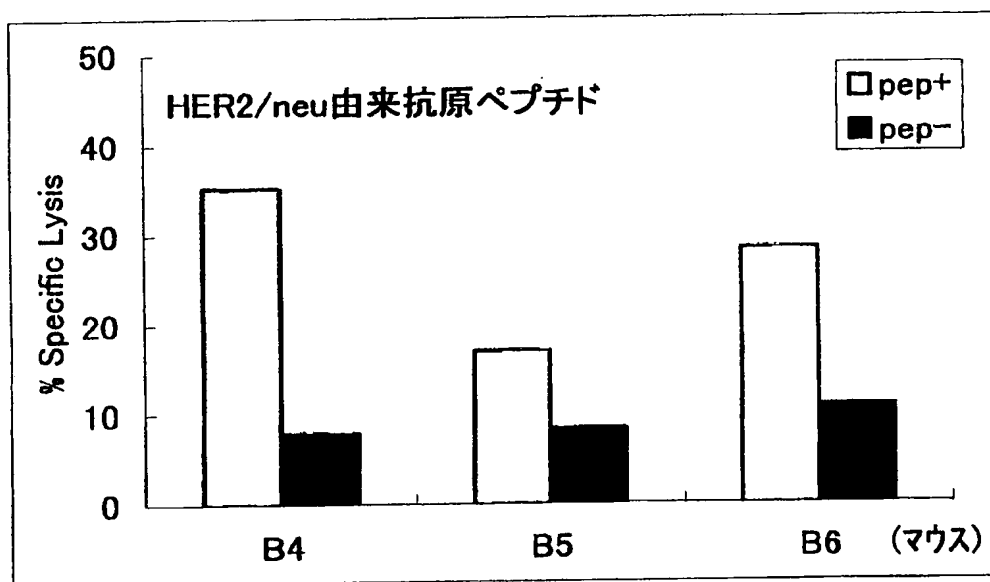
5/21

5

HLA-A*2402/Kb genome HLA-A*2402/Kb cDNA	2700 1015	TTCTCTCAGC CTCCTTTAGA GTGTGCTCTG CTCATCATG GGGAAACAG GACACCCCA CATTCTACT GTCTCTACT GGGTCTGCTG TCAGTTCTGG
HLA-A*2402/Kb genome HLA-A*2402/Kb cDNA	2800 1048	GAACATTCCTA GTGTCAAGAT CTCTCTGGAA CTCTCAGC TTTTCTCTC ACAGTGGAA AAGGAGGGG GATGCTCTG GCTCCAGTT AGTGTGGGGA
HLA-A*2402/Kb genome HLA-A*2402/Kb cDNA	2900 1048	CAGAGTTGTC CTGGGGACAT TGGAGTGGAG TTGGAGTGA TGGAGCTCT GGGATCCAT AATACCTCT CCAGAGAAAT CTCTAGGTG CCTGAGTTGT
HLA-A*2402/Kb genome HLA-A*2402/Kb cDNA	3000 1087	GGCATGAAT GAATATCTAC ATGTACATAT GCATATACAT TGTGTTGTT TTACCTTAG CTCCAGAGC ATTGATCTG CTCTCCAGA TGTAAAGST
HLA-A*2402/Kb genome HLA-A*2402/Kb cDNA	3100 1087	GAACACTTAG GGTCTGATG GGGAGGGCA ATGTGCACAT GATGGGTT CAGGACTCC CAGATCCC TGTGAGTGA TGTGAGTTG TTGCAATCTT
HLA-A*2402/Kb genome HLA-A*2402/Kb cDNA	3200 1119	GTCTTCACAG TGAATGTTCA TGAACCTCAT TGTCTAGCT GATGAGCT GCGTGGAGT GACTGTGGA CAGCAATGT CTCTCATAT CTCTCTGAC
HLA-A*2402/Kb genome HLA-A*2402/Kb cDNA	3300 1119	ATCCAGAGCC CTCAGTTTC TTAGTCAAG TGTCTGATG TCCCTGTAG CCTATGACT CAGTGTGAG AACTGTGAG CCAGTGCAC CCCTCTACAC
HLA-A*2402/Kb genome HLA-A*2402/Kb cDNA	3400 1119	CAGGACCCG TCCCTGACT GCTCTGTCTT CCGTCCCA GCCACCTG CTGGTTCAGC CAAACACTGA GGGACATCTG TAGCCTGTCA CCTCATGCT
HLA-A*2402/Kb genome HLA-A*2402/Kb cDNA	3500 1119	ACCTGACT GCACTCTC ACTTCCAC TCGAATAT AATTGATG TAACCTTAT TGTATATC TTGACCTAG GCTGATTTCT TGTAAATTC
HLA-A*2402/Kb genome HLA-A*2402/Kb cDNA	3600 1119	ATGGATTGAG AATGCTTGA GGTGTTGTT GTTGTGTTGA TTGATTTGT TTTTGAAGA AATAATGAT AGATGATPA ACTTCCAGA TCTGGGTAC
HLA-A*2402/Kb genome HLA-A*2402/Kb cDNA	3700 1119	TATGCTGTGT GTATCTGTT GGCACAGAT GAGCTGTAG AGCTGAGT GAACAGGCT GTCCGAGGT GGGTCACTT TCTTTGATC TGTGATGGG
HLA-A*2402/Kb genome HLA-A*2402/Kb cDNA	3800 1119	CCACACCTCC ACTGTGTAC CTCTGGGCTC TGTTCCTCT ATACTATGA GGCATGCT GAGATTTCT GGTACAAAG ACACAGGGA GGCCTGAGCC
HLA-A*2402/Kb genome HLA-A*2402/Kb cDNA	3857 1119	TTGCTCTGTC CCCAGATTA TGAAGCCCCA GGGTAAGA TGAGAGCTC GGAATTC

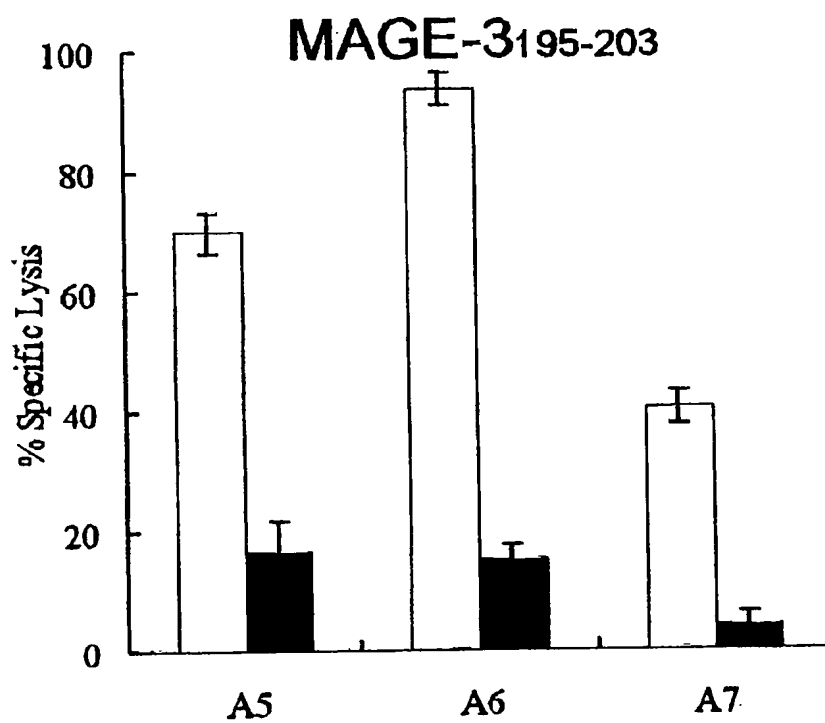
6/21

図 6



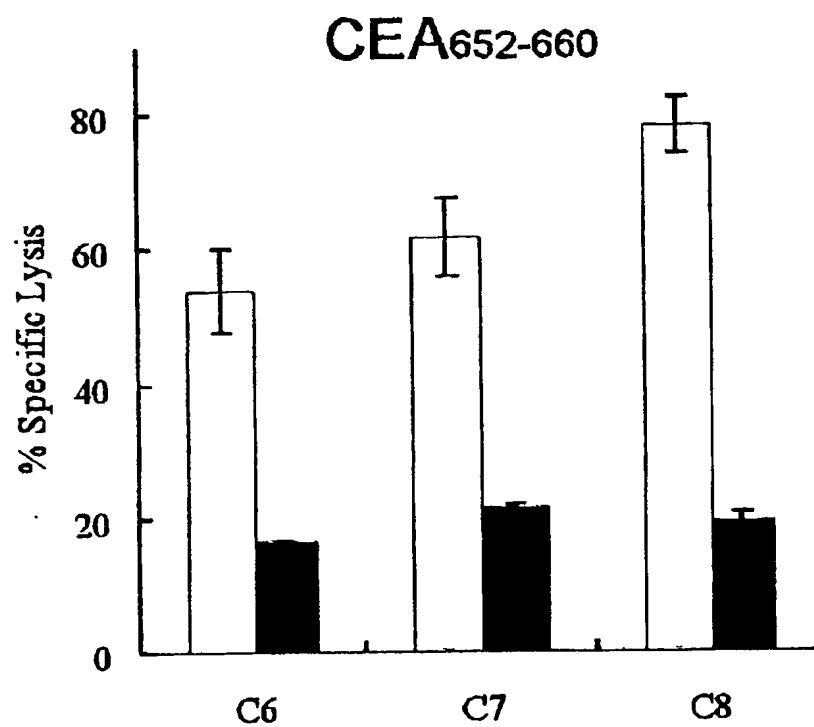
7/21

図 7



8/21

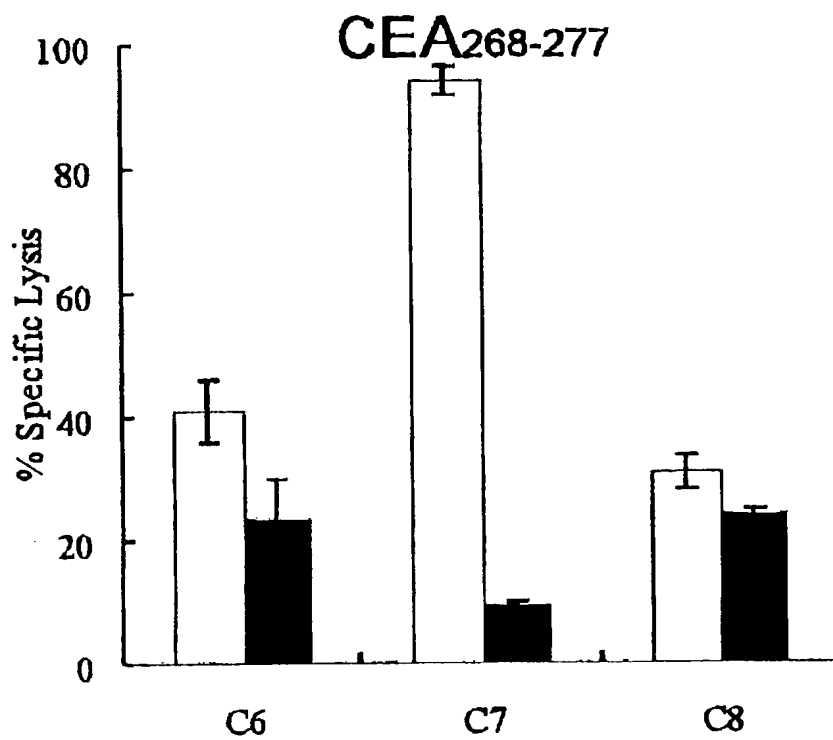
図 8





9/21

図 9



10/21

図 1 0

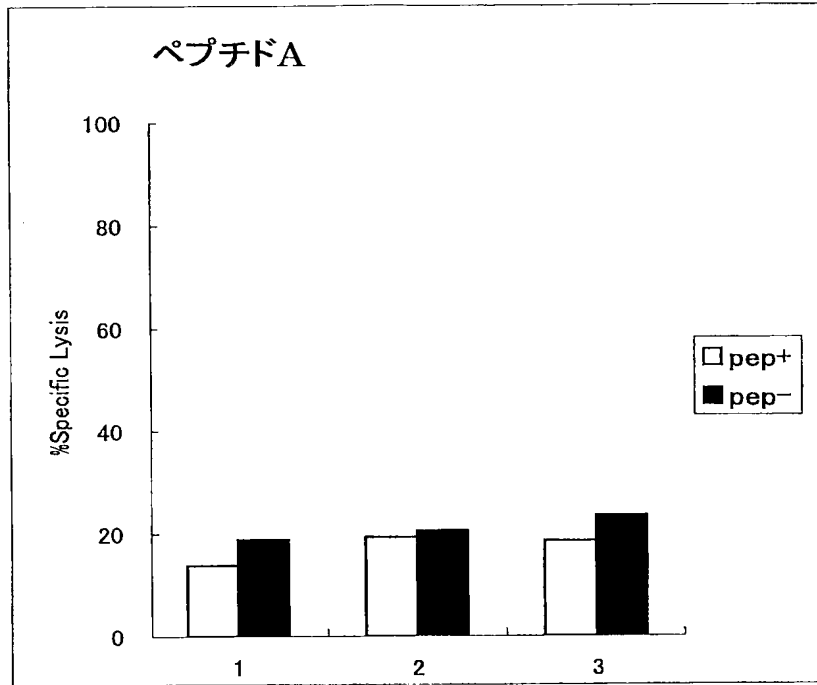
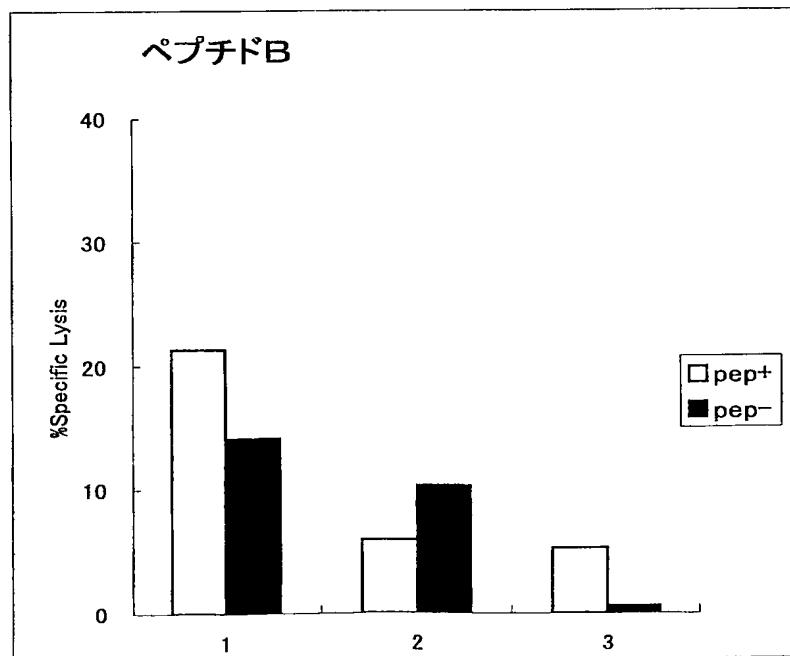


図 1 1



11/21

図 1 2

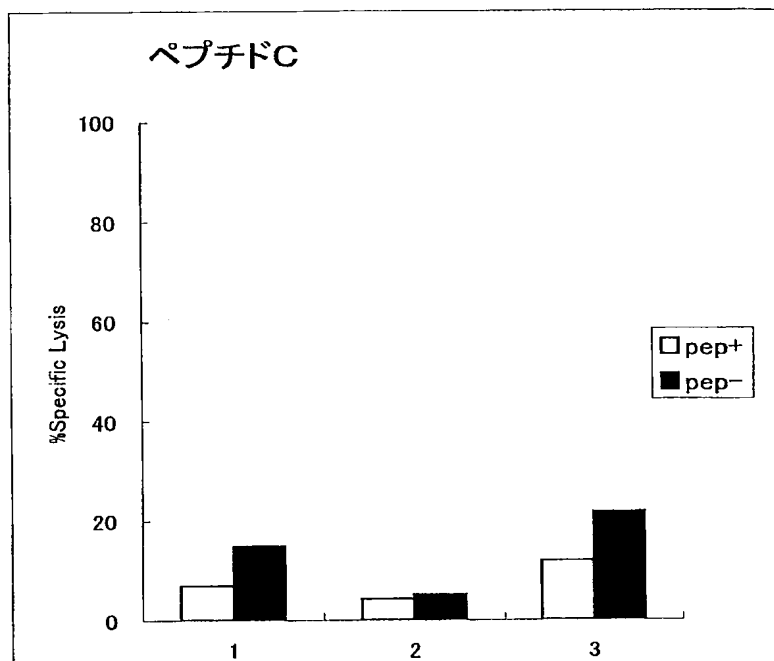
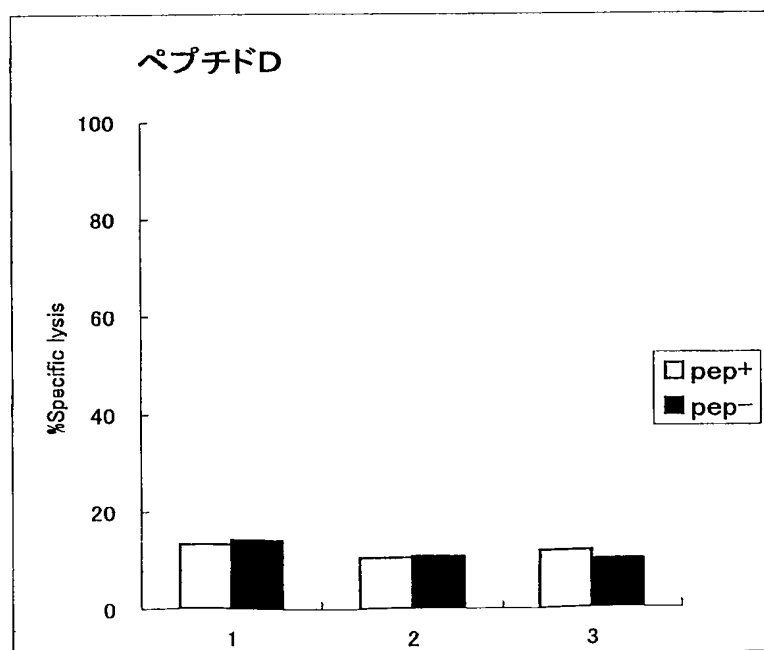


図 1 3



12/21

図 1 4

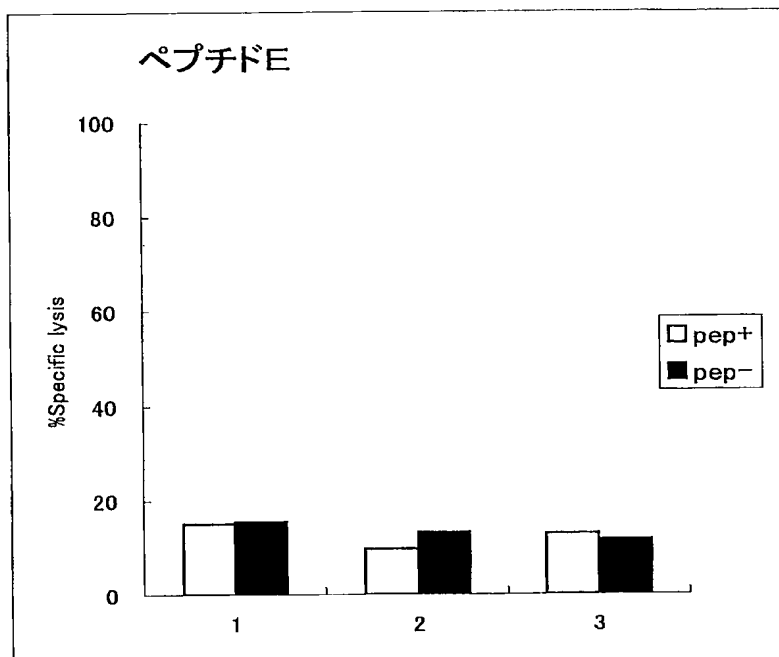
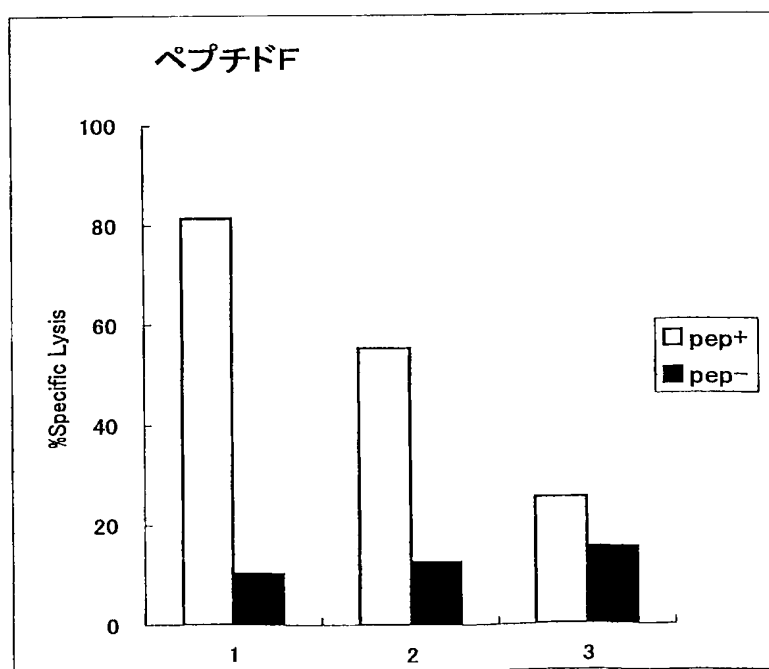


図 1 5



13/21

図 1 6

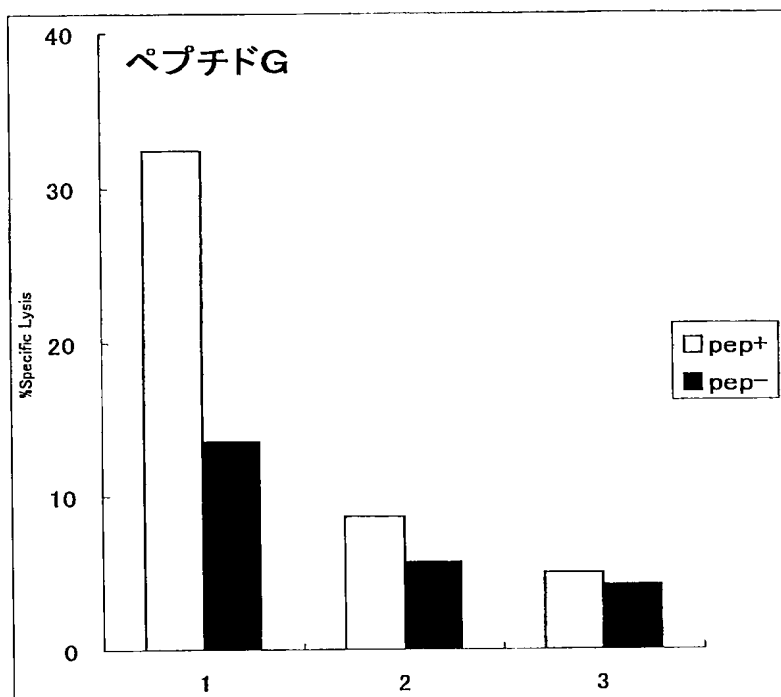
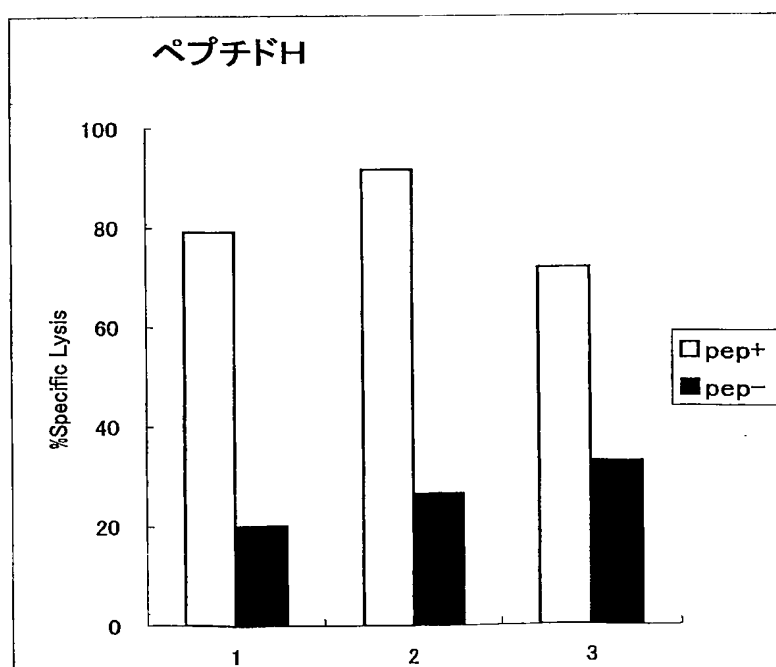


図 1 7



14/21

図 18

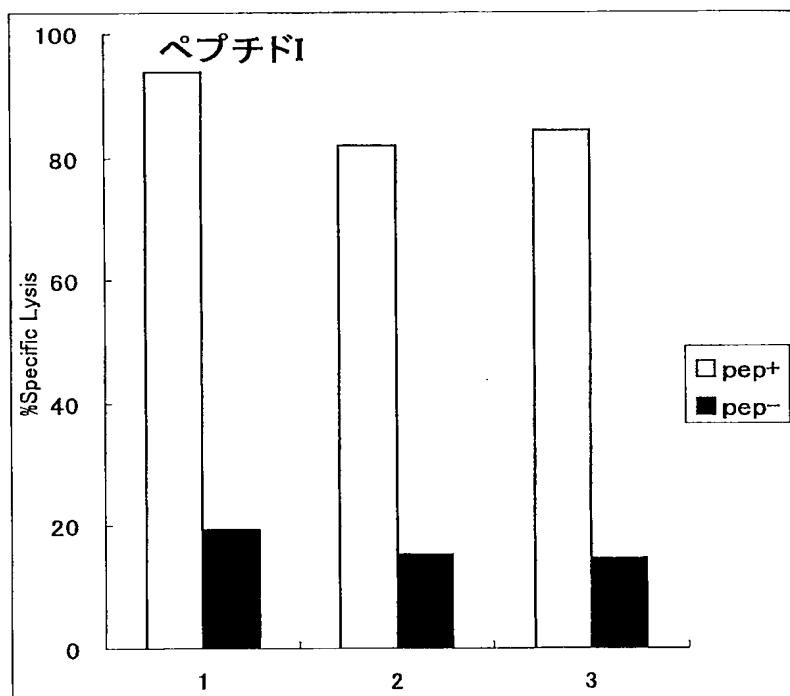
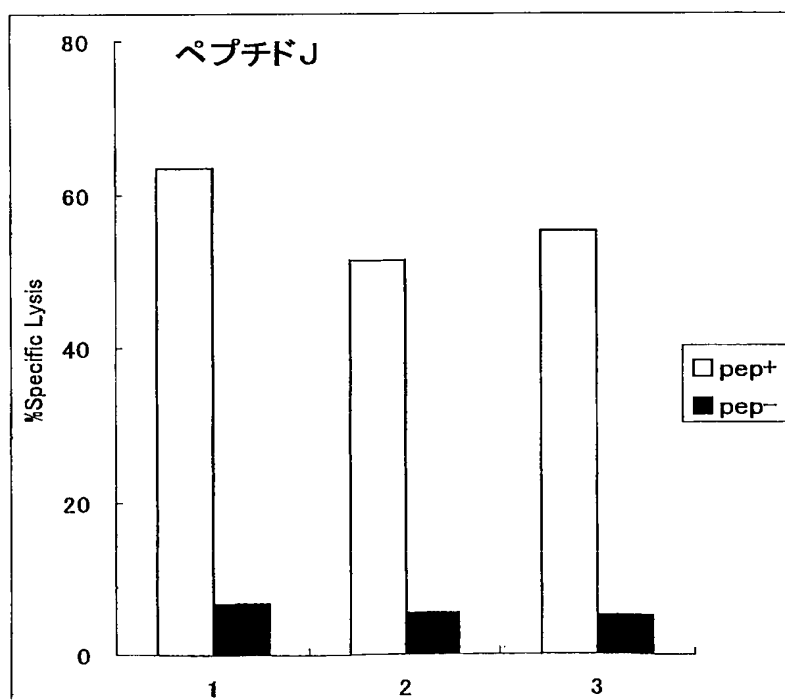


図 19



15/21

図 2 0

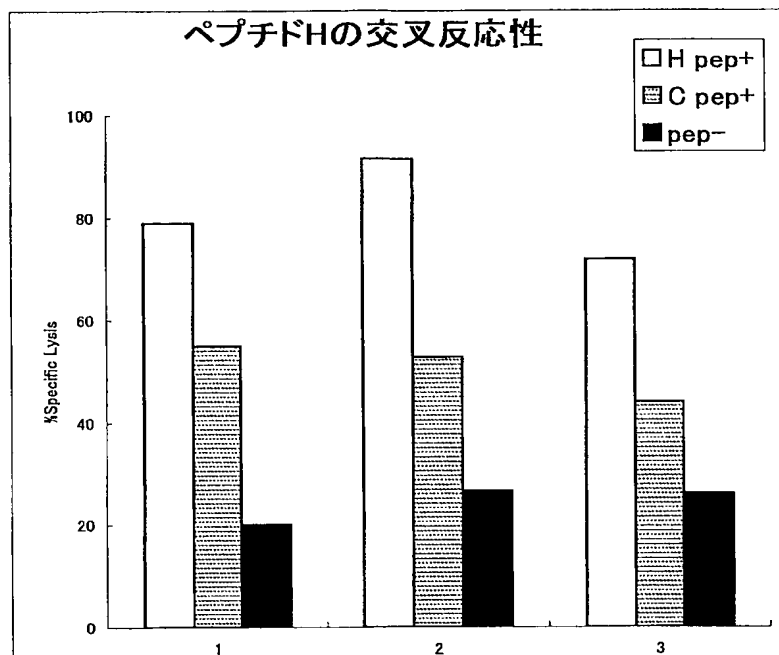
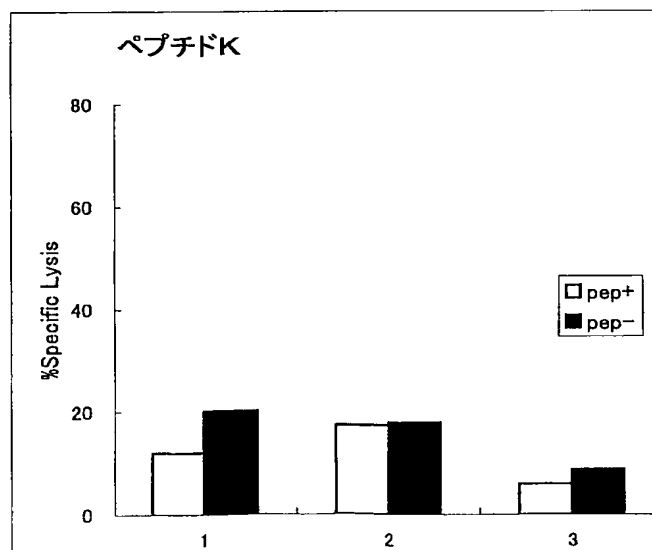
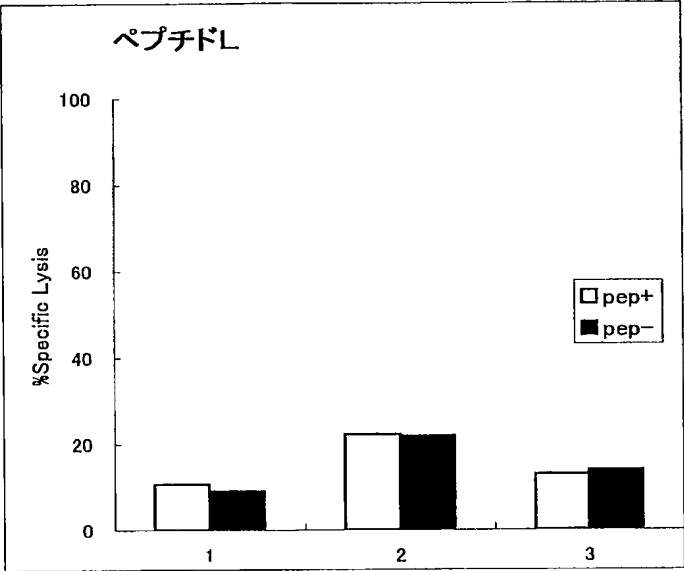


図 2 1



16/21

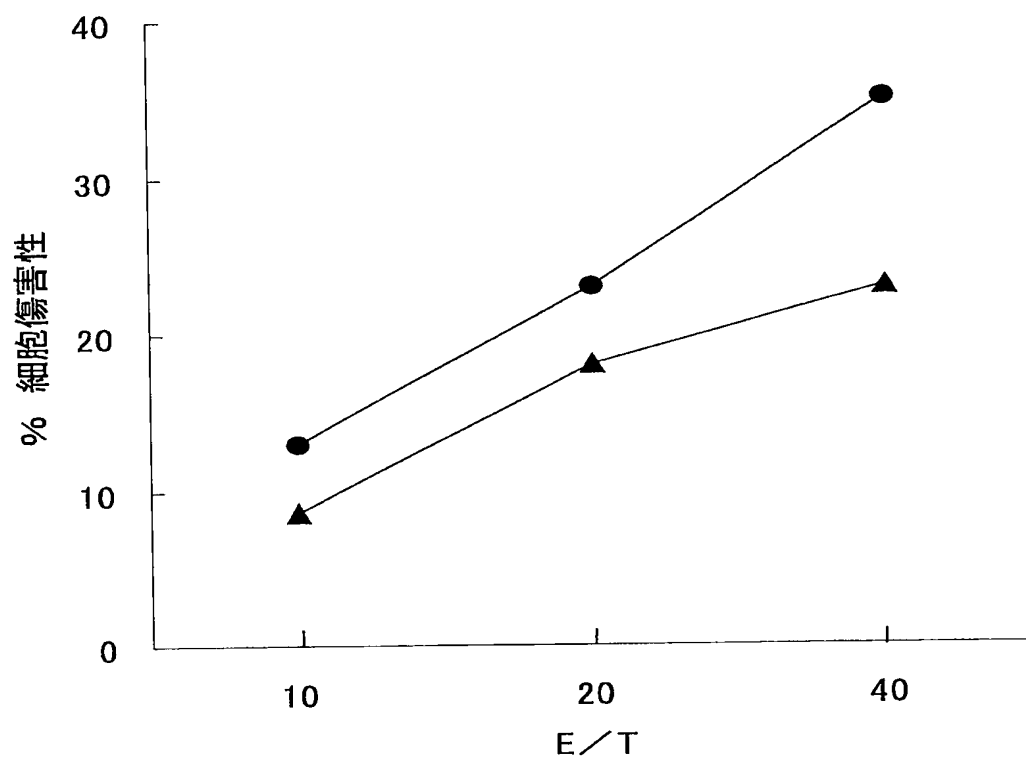
図 2 2





17/21

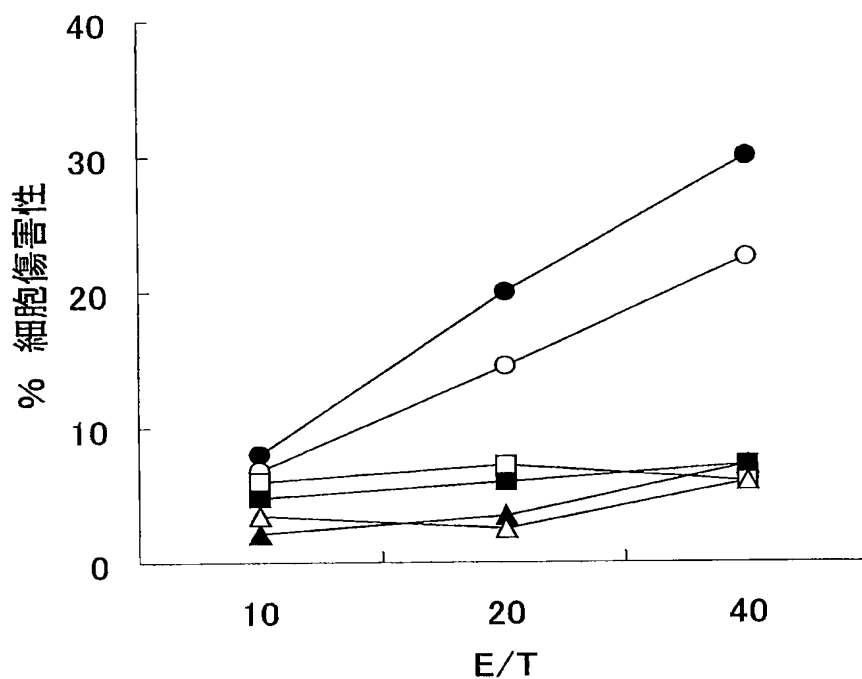
図 2 3



- 多重改変型ペプチド刺激エフェクター細胞  
天然型ペプチドパルスC1R-A\*2402標的細胞
- ▲ 天然型ペプチド刺激エフェクター細胞  
天然型ペプチドパルスC1R-A\*2402標的細胞

18/21

図 2 4



- エフェクター細胞: 多重改変型ペプチド刺激  
標的細胞: RERF-LC-AI細胞 (WT1陽性、HLA-A2402陽性)
- ▲ エフェクター細胞: 多重改変型ペプチド刺激  
標的細胞: LK87細胞 (WT1陽性、HLA-A2402陰性)
- エフェクター細胞: 多重改変型ペプチド刺激  
標的細胞: 11-18細胞 (WT1陰性、HLA-A2402陽性)
- エフェクター細胞: 天然型ペプチド刺激  
標的細胞: RERF-LC-AI細胞 (WT1陽性、HLA-A2402陽性)
- △ エフェクター細胞: 天然型ペプチド刺激  
標的細胞: LK87細胞 (WT1陽性、HLA-A2402陰性)
- エフェクター細胞: 天然型ペプチド刺激  
標的細胞: 11-18細胞 (WT1陰性、HLA-A2402陽性)

19/21

図 2 5

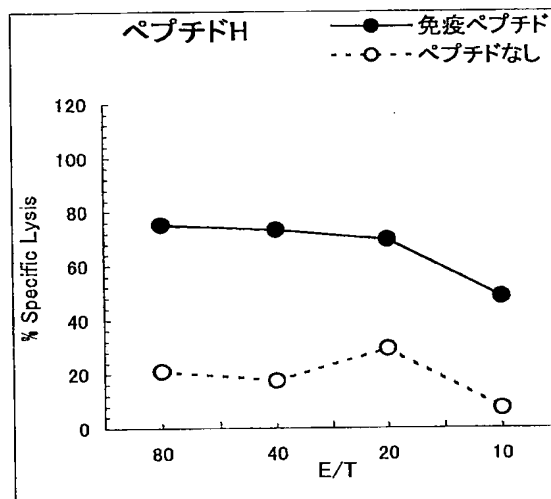
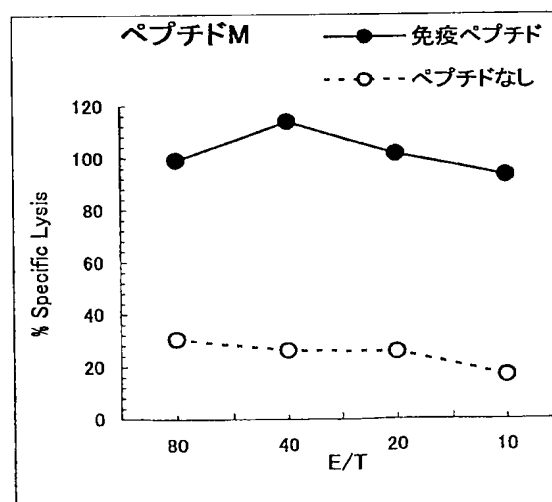


図 2 6



20/21

図 2 7

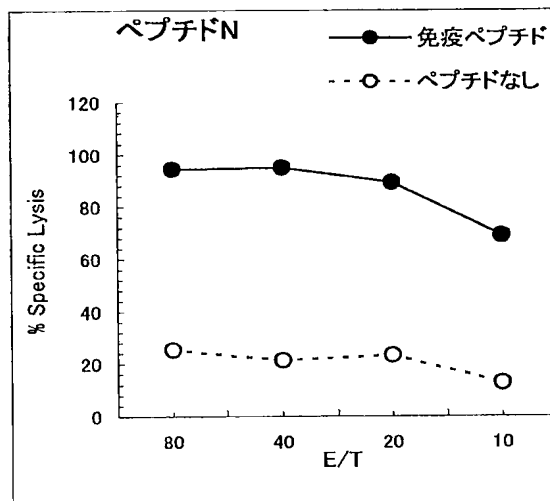


図 2 8

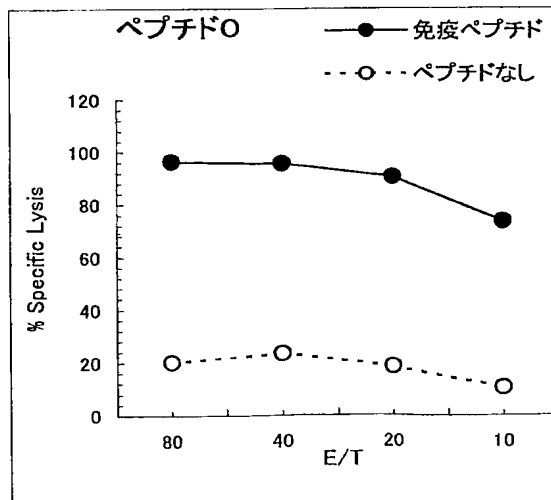


図 2 9

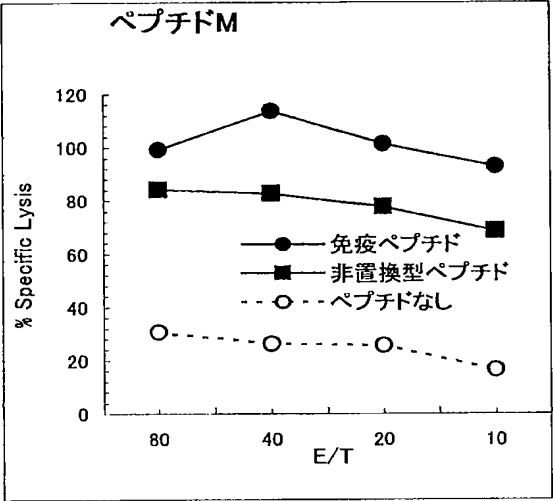
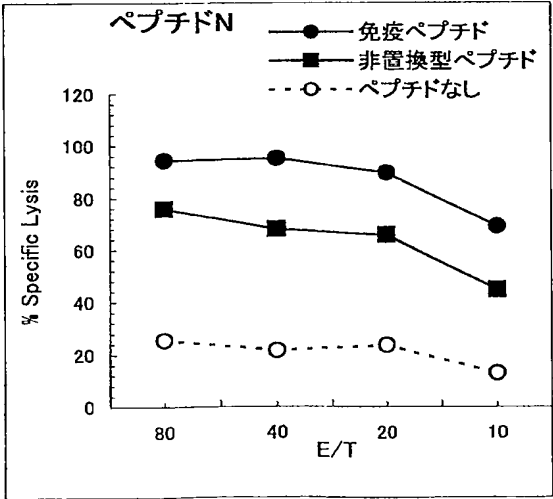


図 3 0



## SEQUENCE LISTING

<110> Haruo Sugiyama  
Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha  
Sumitomo Pharmaceuticals Company, Limited

<120> HLA-A24 restricted tumor antigen peptide

<130> 663830

<150> JP 2002-171518

<151> 2002-6-12

<150> JP 2002-275572

<151> 2002-9-20

<160> 68

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro  
1 5 10 15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala  
20 25 30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr  
35 40 45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro  
50 55 60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly  
65 70 75 80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe  
85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe  
100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe  
115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile  
130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr  
145 150 155 160

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe  
165 170 175

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln  
180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser  
195 200 205

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp  
210 215 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln  
225 230 235 240

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser  
245 250 255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu  
260 265 270

Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile  
275 280 285

His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro  
290 295 300

Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys  
305 310 315 320

Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys  
325 330 335

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro  
340 345 350

Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp  
355 360 365

Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln  
370 375 380

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr  
385 390 395 400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys  
405 410 415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val  
420 425 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala  
435 440 445

Leu

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 2

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu  
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 3

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu  
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 4

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe  
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 5

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu  
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 6

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu  
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 7

Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu  
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 8

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1

5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 9

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe

1

5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 10

Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe

1

5

10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 11

Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe

1

5

10

<210> 12  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 12  
Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Phe  
1 5

<210> 13  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 13  
Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Trp  
1 5

<210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 14  
Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Ile  
1 5

<210> 15  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 15

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Met

1

5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 16

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Phe

1

5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 17

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Trp

1

5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 18

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Ile

1

5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 19

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Met

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 20

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Trp

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 21

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Leu

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 22

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Ile

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 23

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Met

1

5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 24

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Phe

1

5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 25

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Trp

1

5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 26

10/26

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Ile  
1 5

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 27

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Met  
1 5

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 28

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Phe  
1 5

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 29

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Trp  
1 5

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

11/26

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 30

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Ile

1

5

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 31

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Met

1

5

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 32

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser

1

5

10

15

Ala Ser His Leu Glu

20

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 3857

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: The DNA region from position 1 to position 1550 is derived from human, and the DNA region from position 1551 to position 3857 is derived from mouse.

&lt;400&gt; 33



aagcttactc	tctggcacca	aactccatgg	gatgattttt	cttctagaag	agtccaggtg	60
gacaggtaa	gagtgaggag	cagggagtc	agttcaggga	cagagattac	gggatgaaaa	120
gtgaaaggag	agggacgggg	cccatgccga	gggtttctcc	cttgtttctc	agacagctct	180
tgggccaa	ttcagggaga	cattgagaca	gagcgcttgg	cacagaagca	gaggggtcag	240
ggcgaagtcc	cagggcccca	ggcgtggctc	tcagggtctc	aggccccgaa	ggcgggtgtat	300
ggattgggga	gtcccagcct	tggggattcc	ccaactccgc	agtttctttt	ctccctctcc	360
caacctatgt	agggtccttc	ttcctggata	ctcacgacgc	ggaccaggtt	ctcactccca	420
ttgggtgtcg	ggtttccaga	gaagccaatc	agtgtcgtcg	cggtcgctgt	tctaaagtcc	480
gcacgcaccc	accgggactc	agattctccc	cagacgccga	ggatggccgt	catggcgccc	540
cgaacctctg	tctgtctact	ctcggggggc	ctggccctga	cccagacctg	ggcaggtgag	600
tgcggggctg	ggagggaaac	ggcctctcgc	gggagaagca	aggggcccg	ctggcggggg	660
cgcaagaccc	gggaagccgc	gccggggagga	gggtcggggc	ggtctcagcc	actcctcgtc	720
cccaggctcc	cactccatga	ggtattttct	cacatccgtg	tcccggccc	gccgcgggga	780
gccccgcttc	atcgccgtgg	gctacgtgga	cgacacgcag	ttcgtgcggt	tcgacagcga	840
cgcgcgcagc	cagaggatgg	agccgcgggc	gccgtggata	gagcaggagg	ggccggagta	900
ttgggacgag	gagacaggga	aagtgaaggc	ccactcacag	actgaccgag	agaacctgcg	960
gatcgcgctc	cgctactaca	accagagcga	ggccggtgag	tgaccccggc	ccggggcgca	1020
ggtcacgacc	cctcatcccc	cacggacggg	ccgggtcgcc	cacagtctcc	gggtccgaga	1080
tccaccccga	agccgcggga	ccccgagacc	cttgccccgg	gagaggccca	ggcgccctaa	1140
cccggtttca	ttttcagttt	aggccaaaaa	tcccccggg	ttggtcgggg	ccgggcgggg	1200
ctcgggggac	tgggtcgacc	gcggggctcg	ggccagggtc	tcacaccctc	cagatgatgt	1260
ttggctgcga	cgtggggctg	gacgggcgct	tcctccgcgg	gtaccaccag	tacgcctacg	1320
acggcaagga	ttacatcgcc	ctgaaagagg	acctgcgctc	ttggaccgcg	gcggacatgg	1380
cggctcagat	caccaagcgc	aagtgggagg	cggcccatgt	ggcggagcag	cagagagcct	1440
acctggaggg	cacgtgcgtg	gacgggctcc	gcagatacct	ggagaacggg	aaggagacgc	1500
tgcagcgcac	gggtaccagg	ggccacgggg	cgcctacctg	atcgctgtga	gatcctgtgt	1560
gacacacctg	taccttgtcc	cccagagtca	ggggctggga	gtcattttct	ctggctacac	1620
acttagtgat	ggctgttcac	ttggactgac	agttaatgtt	ggtcagcaag	gtgactacaa	1680
tggttgagtc	tcaatggtgt	caccttcag	gatcatacag	ccctaatttt	aatatgaact	1740
caaacacata	ttaaattagt	tattttccat	tccctctctc	attctttgac	tacctctctc	1800
atgctattga	acatcacata	aggatggcca	tgtttacca	atggctcatg	tggattccct	1860
cttagcttct	gagtcccaaa	agaaaatgtg	cagtccctgtg	ctgaggggac	cagctctgct	1920
tttggctact	agtgcgatga	cagttgaagt	gtcaaacaga	cacatagttc	actgtcatca	1980
ttgatttaac	tgagtcttgg	gtagatttca	gtttgtcttg	ttaattgtgt	gatttcttaa	2040
atcttccaca	cagattcccc	aaaggcccat	gtgaccatc	acagcagacc	tgaagataaa	2100
gtcacccctga	ggtgctgggc	cctgggcctc	tacctgctg	acatcacctc	gacctggcag	2160
ttgaatgggg	aggagctgat	ccaggacatg	gagcttgttg	agaccaggcc	tgcaggggat	2220
ggaaccttcc	agaagtgggc	atctgtggtg	gtgcctcttg	ggaaggagca	gtattacaca	2280
tgccatgtgt	accatcaggg	gctgcctgag	ccccacccc	tgagatgggg	taaggagagt	2340
gtgggtgcag	agctggggtc	agggaaagct	ggagctttct	gcagaccctg	agctgctcag	2400
ggctgagagc	tggggctcatg	acctcacct	tcatttcttg	tacctgtcct	tcccagagcc	2460
tcctccatcc	actgtctcca	acatggcgac	cgttgcgtgt	ctggttgtcc	ttggagctgc	2520
aatagtcact	ggagctgttg	tggcttttgt	gatgaagatg	agaaggagaa	acacaggtag	2580
gaaagggcag	agtctgagtt	ttctctcagc	ctcctttaga	gtgtgctctg	ctcatcaatg	2640
gggaacacag	gcacacccca	cattgtctact	gtctctaact	gggtctgctg	tcagttcttg	2700
gaatticcta	gtgtcaagat	cttcctggaa	ctctcacagc	tttctctctc	acaggtggaa	2760
aaggagggga	ctatgctctg	gtccagggt	agtgtgggga	cagagttgtc	ctggggacat	2820
tggagtgaag	ttggagatga	tgggagctct	gggaatccat	aatagctcct	ccagagaaat	2880

```

cttctaggtg cctgagttgt gccatgaaat gaatatgtac atgtacatat gcatatacat 2940
ttgttttgtt ttaccctagg ctcccagacc tctgatctgt ctctcccaga ttgtaaaggt 3000
gacactctag ggtctgattg gggaggggca atgtggacat gattgggttt caggaactcc 3060
cagaatcccc tgtgagttag tgatgggttg ttccaatgtt gtcttcacag tgatggttca 3120
tgacctcat tctctagcgt gaagacagct gcctggagtg gacttgggtga cagacaatgt 3180
cttctcatat ctctgtgac atccagagcc ctccagttctc tttagtcaag tgtctgatgt 3240
tccctgtgag cctatggact caatgtgaag aactgtggag cccagtccac ccctctacac 3300
caggacctg tccctgcact gctctgtctt ccttccaca gccaaccttg ctggttcage 3360
caaacactga gggacatctg tagcctgtca gctccatgct accctgacct gcaactctc 3420
acttccacac tgagaataat aatttgaatg taaccttgat tgttatcatc ttgacctagg 3480
gctgatttct tgttaatttc atggattgag aatgcttaga ggttttgttt gtttgtttga 3540
ttgatttgtt tttttgaaga aataaatgat agatgaataa acttccagaa tctgggtcac 3600
tatgctgtgt gtatctgttg ggacaggatg agactgtagc agctgagtgt gaacagggt 3660
gtgccgaggt gggctcagtt tgccttgatc tgtgatggg ccacacctcc actgtgtcac 3720
ctctgggtc tgttccctct atcaactatga ggcacatgct gagagtttgt ggtcacaaag 3780
acacagggaa ggcctgagcc ttgccctgtc ccaggattt tgagcccca gggctaaaga 3840
tcagagactc ggaattc 3857

```

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 1119

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: The DNA region from position 1 to position 618 is derived from human, and the DNA region from position 619 to position 1119 is derived from mouse.

&lt;400&gt; 34

```

atg gcc gtc atg gcg ccc cga acc ctc gtc ctg cta ctc tcg ggg gcc 48
Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala
          5                      10                      15

```

```

ctg gcc ctg acc cag acc tgg gca ggc tcc cac tcc atg agg tat ttc 96
Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
          20                      25                      30

```

```

tcc aca tcc gtg tcc cgg ccc ggc cgc ggg gag ccc cgc ttc atc gcc 144
Ser Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala
          35                      40                      45

```

```

gtg ggc tac gtg gac gac acg cag ttc gtg cgg ttc gac agc gac gcc 192
Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala
          50                      55                      60

```

```

gcg agc cag agg atg gag ccg cgg gcg ccg tgg ata gag cag gag ggg 240
Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly

```

14/26

65	70	75	80	
cgc gag tat tgg gac gag gag aca ggg aaa gtg aag gcc cac tca cag				288
Pro Glu Tyr Trp Asp Glu Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala His Ser Gln				
	85	90	95	
act gac cga gag aac ctg cgg atc gcg ctc cgc tac tac aac cag agc				336
Thr Asp Arg Glu Asn Leu Arg Ile Ala Leu Arg Tyr Tyr Asn Gln Ser				
	100	105	110	
gag gcc ggt tct cac acc ctc cag atg atg ttt ggc tgc gac gtg ggg				384
Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln Met Met Phe Gly Cys Asp Val Gly				
	115	120	125	
tcg gac ggg cgc ttc ctc cgc ggg tac cac cag tac gcc tac gac ggc				432
Ser Asp Gly Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly				
	130	135	140	
aag gat tac atc gcc ctg aaa gag gac ctg cgc tct tgg acc gcg gcg				480
Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala				
	145	150	155	160
gac atg gcg gct cag atc acc aag cgc aag tgg gag gcg gcc cat gtg				528
Asp Met Ala Ala Gln Ile Thr Lys Arg Lys Trp Glu Ala Ala His Val				
	165	170	175	
gcg gag cag cag aga gcc tac ctg gag ggc acg tgc gtg gac ggg ctc				576
Ala Glu Gln Gln Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu				
	180	185	190	
cgc aga tac ctg gag aac ggg aag gag acg ctg cag cgc acg gat tcc				624
Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ser				
	195	200	205	
cca aag gcc cat gtg acc cat cac agc aga cct gaa gat aaa gtc acc				672
Pro Lys Ala His Val Thr His His Ser Arg Pro Glu Asp Lys Val Thr				
	210	215	220	
ctg agg tgc tgg gcc ctg ggc ttc tac cct gct gac atc acc ctg acc				720
Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr				
	225	230	235	240
tgg cag ttg aat ggg gag gag ctg atc cag gac atg gag ctt gtg gag				768
Trp Gln Leu Asn Gly Glu Glu Leu Ile Gln Asp Met Glu Leu Val Glu				
	245	250	255	
acc agg cct gca ggg gat gga acc ttc cag aag tgg gca tct gtg gtg				816
Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ser Val Val				

15/26

260					265					270						
gtg	cct	ctt	ggg	aag	gag	cag	tat	tac	aca	tgc	cat	gtg	tac	cat	cag	864
Val	Pro	Leu	Gly	Lys	Glu	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Cys	His	Val	Tyr	His	Gln	
275					280					285						
ggg	ctg	cct	gag	ccc	ctc	acc	ctg	aga	tgg	gag	cct	cct	cca	tcc	act	912
Gly	Leu	Pro	Glu	Pro	Leu	Thr	Leu	Arg	Trp	Glu	Pro	Pro	Pro	Ser	Thr	
290					295					300						
gtc	tcc	aac	atg	gcg	acc	gtt	gct	gtt	ctg	gtt	gtc	ctt	gga	gct	gca	960
Val	Ser	Asn	Met	Ala	Thr	Val	Ala	Val	Leu	Val	Val	Leu	Gly	Ala	Ala	
305					310					315					320	
ata	gtc	act	gga	gct	gtg	gtg	gct	ttt	gtg	atg	aag	atg	aga	agg	aga	1008
Ile	Val	Thr	Gly	Ala	Val	Val	Ala	Phe	Val	Met	Lys	Met	Arg	Arg	Arg	
325					330					335						
aac	aca	ggt	gga	aaa	gga	ggg	gac	tat	gct	ctg	gct	cca	ggc	tcc	cag	1056
Asn	Thr	Gly	Gly	Lys	Gly	Gly	Asp	Tyr	Ala	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Gln	
340					345					350						
acc	tct	gat	ctg	tct	ctc	cca	gat	tgt	aaa	gtg	atg	gtt	cat	gac	cct	1104
Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Leu	Pro	Asp	Cys	Lys	Val	Met	Val	His	Asp	Pro	
355					360					365						
cat	tct	cta	gcg	tga											1119	
His	Ser	Leu	Ala													
370																

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 372

&lt;212&gt; PRT

### <213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> Description of Artificial Sequence: The polypeptide region from position 1 to position 206 is derived from human, and the polypeptide region from position 207 to position 372 is derived from mouse.

<400> 35

Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala  
5 10 15

Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe  
20 25 30

Ser Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala  
 35 40 45  
 Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala  
 50 55 60  
 Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Tyr Trp Asp Glu Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala His Ser Gln  
 85 90 95  
 Thr Asp Arg Glu Asn Leu Arg Ile Ala Leu Arg Tyr Tyr Asn Gln Ser  
 100 105 110  
 Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln Met Met Phe Gly Cys Asp Val Gly  
 115 120 125  
 Ser Asp Gly Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly  
 130 135 140  
 Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala  
 145 150 155 160  
 Asp Met Ala Ala Gln Ile Thr Lys Arg Lys Trp Glu Ala Ala His Val  
 165 170 175  
 Ala Glu Gln Gln Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu  
 180 185 190  
 Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ser  
 195 200 205  
 Pro Lys Ala His Val Thr His His Ser Arg Pro Glu Asp Lys Val Thr  
 210 215 220  
 Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr  
 225 230 235 240  
 Trp Gln Leu Asn Gly Glu Glu Leu Ile Gln Asp Met Glu Leu Val Glu  
 245 250 255  
 Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ser Val Val  
 260 265 270  
 Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Tyr Tyr Thr Cys His Val Tyr His Gln  
 275 280 285

17/26

Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Pro Pro Ser Thr  
 290 295 300

Val Ser Asn Met Ala Thr Val Ala Val Leu Val Val Leu Gly Ala Ala  
 305 310 315 320

Ile Val Thr Gly Ala Val Val Ala Phe Val Met Lys Met Arg Arg Arg  
 325 330 335

Asn Thr Gly Gly Lys Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Ala Pro Gly Ser Gln  
 340 345 350

Thr Ser Asp Leu Ser Leu Pro Asp Cys Lys Val Met Val His Asp Pro  
 355 360 365

His Ser Leu Ala  
 370

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: PCR primer

&lt;400&gt; 36

cccaagctta ctctctggca ccaaactcca tgggat

36

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: PCR primer

&lt;400&gt; 37

cgggagatct acaggcgatc aggtaggcgc

30

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 38

cgcaggctct cactatctc aggtgatctc

30

<210> 39

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 39

cgggaattccg agtctctgat ctttagccct gggggctc

38

<210> 40

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 40

aggacttgga ctctgagagg cagggtctt

29

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 41

catagtcctc tccttttcca cctgtgagaa

30

<210> 42

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 42

cgaaccctcg tcctgtact ctc

23

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 43

agcatagtcc cctccttttc cac

23

<210> 44

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 44

cccaagcttc gccgaggatg gccgtcatgg cgccccgaa

39

<210> 45

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 45

ccggaattct gtcttcacgc tagagaatga gggcatgaa c

41

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 46

Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile

5

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 47

Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile

5

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 48

Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu

5

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 49

Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn Gly Thr Phe

5

10

&lt;210&gt; 50

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 50

Ala	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Ile	Gly	Ile	Thr	Glu	Leu
1				5				10						15	

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 51

Ala	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Pro	Ser	Leu
1				5				

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 52

Asn	Gln	Met	Asn	Leu	Gly	Ala	Thr	Leu
1				5				

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 53

Arg Phe Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu  
1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 54

Arg Trp Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu  
1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 55

Arg Phe Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu  
1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 56

Arg Met Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu  
1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 57

Arg Trp Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu

1

5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 58

Arg Phe Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe

1

5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 59

Arg Met Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe

1

5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 60

Ala Phe Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu

1

5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 61

Ala Met Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu

1

5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 62

Ala Trp Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu

1

5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 63

Asn Phe Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu

1

5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 64

Asn Met Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 65

Asn Trp Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 66

Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 67

Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<223> Xaa at position 5 stands for Abu.

<400> 68

Arg Tyr Pro Ser Xaa Gln Lys Lys Phe  
1 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07463

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, 1/19, 1/21, 5/10, C07K7/06, 14/82, C12P21/02,  
C07K16/32, A61K38/17, 39/00, 39/395, A61K31/7088,  
A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, 1/19, 1/21, 5/10, C07K7/06, 14/82, C12P21/02,  
C07K16/32, A61K38/17, 39/00, 39/395, A61K31/7088,  
A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus/JMEDPlus (JOIS), PubMed  
CA/REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AZUMA, T. et al., Identification of a novel WT1-derived peptide which induces human leucocyte antigen-A24-restricted anti-leukaemia cytotoxic T lymphocytes., British Journal of Haematology, March 2002, Vol.116, No.3, pages 601 to 603	1-3, 5-20
X	WO 00/18795 A2 (Corixa Corp.), 06 April, 2000 (06.04.00), Sequence ID No. 195; table 5 & EP 1117687 A2 & AU 6407899 A & CN 1336935 A & BR 9914116 A	1-4, 7-20, 22-24
A	OHMINAMI, H. et al., HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8 <sup>+</sup> cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide., BLOOD, January 2000, Vol.95, No.1, pages 286 to 292	1-20, 22-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
01 September, 2003 (01.09.03)

Date of mailing of the international search report  
16 September, 2003 (16.09.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07463

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 21, 25

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 21 and 25 pertain to "methods for treatment of the human body by surgery or therapy and diagnostic methods" as specified in PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/12, 1/19, 1/21, 5/10, C07K7/06, 14/82, C12P21/02, C07K16/32, A61K38/17, 39/00, 39/395, A61K31/7088, A61P35/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/12, 1/19, 1/21, 5/10, C07K7/06, 14/82, C12P21/02, C07K16/32, A61K38/17, 39/00, 39/395, A61K31/7088, A61P35/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus/JMEDPlus (JOIS), PubMed CA/REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Azuma T., et al. Identification of a novel WT1-derived peptide which induces human leucocyte antigen-A24-restricted anti-leukaemia cytotoxic T lymphocytes. British Journal of Haematology March 2002, Vol.116, No.3, p.601-603	1-3, 5-20
X	WO 00/18795 A2 (Corixa Corporation) 2000.04.06 Sequence ID No.195, TABLE 5 & EP 1117687 A2 & AU 6407899 A & CN 1336935 A & BR 9914116 A	1-4, 7-20, 22-24
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 01.09.03	国際調査報告の発送日 16.09.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 北村 弘樹	4B 9349
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Ohminami H., et al. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8 <sup>+</sup> cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. BLOOD January 2000, Vol.95, No.1, p.286-292	1-20, 22-24

## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 21, 25 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲 21, 25 に記載されている発明は、PCT 規則 39.1(iv) の「人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法」に該当する。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。